

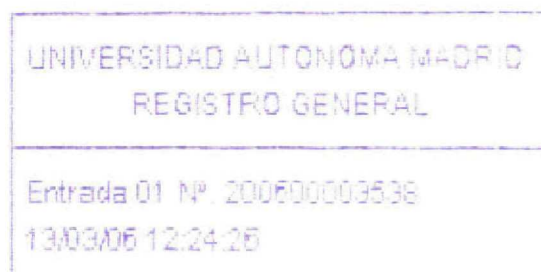
14
2006/03/06
2255

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



**ESTUDIO DE MARCADORES INFLAMATORIOS EN
EL CONDENSADO DE AIRE EXHALADO Y
SANGRE DE DOS FENOTIPOS DE EPOC**

TESIS DOCTORAL



Reg. F.H. 25.925



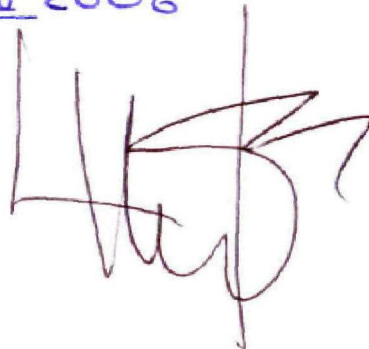
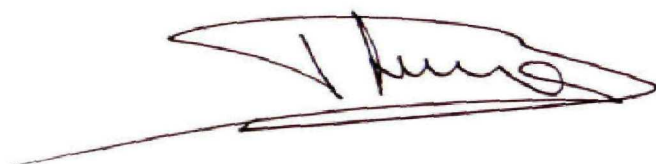
CARLOS ALMONACID SANCHEZ

Madrid, 2006.

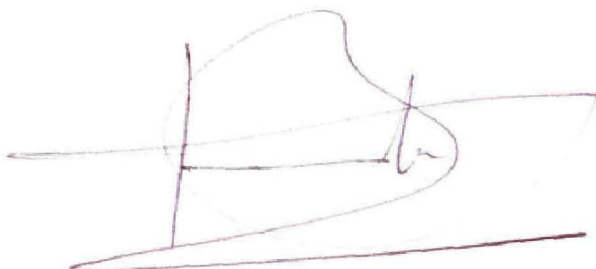
Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de satisfactoria

Madrid, 9 de mayo de 2006

"cum laude" por unanimidad

A stylized signature in blue ink, featuring a large loop and a checkmark-like flourish.A signature in blue ink, consisting of several vertical and horizontal strokes.A signature in blue ink, with a long horizontal line extending to the left.

Pff. en pl. Waller

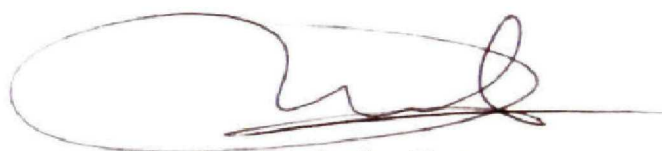
A signature in blue ink, featuring a large loop and a horizontal line.

D. José Luis Izquierdo Alonso, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares.

CERTIFICA

Que D. Carlos Almonacid Sánchez, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“Estudio de marcadores inflamatorios en el condensado de aire exhalado y sangre de dos fenotipos de EPOC”**. Tras examinar y revisar dicho trabajo considero que reúne los criterios de originalidad, rigor científico y calidad, por lo que doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a 9 de enero de dos mil seis.

A handwritten signature in dark ink, consisting of a large, stylized 'J' followed by a series of loops and a horizontal line extending to the right.

Fdo: Dr. Izquierdo Alonso

D. Julio Ancochea Bermúdez, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA

Que D. Carlos Almonacid Sánchez, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“Estudio de marcadores inflamatorios en el condensado de aire exhalado y sangre de dos fenotipos de EPOC”**. Tras examinar y revisar dicho trabajo considero que reúne los criterios de originalidad, rigor científico y calidad, por lo que doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a 9 de enero de dos mil seis.



Fdo: Dr. Ancochea Bermúdez

ÍNDICE

1. PRESENTACIÓN	4
2. AGRADECIMIENTOS.....	5
3. SUBVENCIONES	6
4. EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR SOBRE EL TEMA DE ESTUDIO:	7
5. INTRODUCCIÓN	8
5.1 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA,	22
5.2 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA.....	26
5.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA OBTENCIÓN DEL CONDENSADO	31
5.4 SEGURIDAD DE LA TÉCNICA	42
5.5 ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS	43
5.6 MEDICIÓN DE LOS BIOMARCADORES NO VOLÁTILES EN EL CONDENSADO	44
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	51
7. UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO.....	52
8. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	53
9. PACIENTES Y MÉTODOS	54
9.1 POBLACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO	54
9.2 ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO	57
9.3 DESARROLLO DEL ESTUDIO.....	57
9.4 TÉCNICAS EMPLEADAS:	59
9.4.1 Variables clínicas.....	59
9.4.2 Técnicas de imagen	62

9.4.3 Estudio funcional respiratorio.....	64
9.4.4 Obtención del condensado de aire exhalado.....	66
9.4.5 Descripción del condensador de aire exhalado.....	66
9.4.6 Procesado de las muestras de condensado.....	77
9.4.7 Análisis del pH en las muestras de condensado.....	77
9.4.8 Análisis de los marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo.	80
9.5 TAMAÑO DE LA MUESTRA	87
9.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	87
10. RESULTADOS	89
11. DISCUSIÓN	107
12. CONCLUSIONES	120
13. BIBLIOGRAFÍA	121

1. PRESENTACIÓN

La presente tesis doctoral está estructurada como un trabajo científico original pendiente de ser aceptado para su publicación.

La memoria se fundamenta en la presentación de los resultados de este artículo. El artículo versa sobre los marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo hallados en distintos fenotipos de pacientes diagnosticados de EPOC con similar grado de obstrucción utilizando como grupo control a pacientes fumadores sanos.

El tema de esta tesis doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación desarrollada en los últimos años en la Sección de Neumología y la Unidad de Investigación del Hospital General Universitario de Guadalajara.

Los estudios llevados a cabo en esta tesis doctoral han sido realizados en el Laboratorio de Fisiopatología Respiratoria y la Unidad de Investigación de la Sección de Neumología del Hospital Universitario de Guadalajara.

2. AGRADECIMIENTOS

A José Luis, por su gran apoyo, ejemplo, capacidad de trabajo y paciencia, así como por darme la oportunidad de trabajar y aprender con su equipo.

A Julio por sus consejos y amistad.

A mis compañeros de Sección, José, Ignacio, Jesús, Jorge y Fernando por su gran apoyo.

A Trinidad y Jaime por su inestimable ayuda, gran disposición de trabajo y paciencia.

A Inmaculada, Esperanza, María Soledad, Charo y Agustina por el gran cariño que siempre me han mostrado y por su gran apoyo.

A mis padres y hermanos por su apoyo y confianza.

A María José por su inestimable ayuda y apoyo en los momentos buenos y malos.

3. SUBVENCIONES

Este trabajo ha sido financiado a través de NEUMOMADRID (Sociedad Madrileña de Neumología y Cirugía Torácica) y el SESCAM (Servicio Regional de Salud de Castilla La Mancha) - Beca GC03002.

4. EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR SOBRE EL TEMA DE ESTUDIO:

La Sección de Neumología del Hospital Universitario de Guadalajara ha trabajado ampliamente en el campo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tanto en ensayos clínicos (fase II, III y IV), como en estudios epidemiológicos (El Dr Izquierdo ha sido el responsable nacional del estudio IDENTEPOC y el representante español del proyecto Confronting COPD) y en estudios inmunológicos (en colaboración con el departamento de Inmunología de la Universidad de Alcalá de Henares). También ha desarrollado estudios dirigidos a conocer mejor las características fenótípicas de la EPOC, algunos como colaborador en los Laboratorios Meakins Christie de la Universidad McGill de Montreal.

La Dra Trinidad Parra Cid es la responsable del laboratorio de la Unidad de investigación del Hospital Universitario de Guadalajara. En Diciembre de 2002 esta Unidad ha sido reconocida de forma oficial (evaluación de ANEP, D.O.C.M. Núm. 154, 11 Diciembre de 2002) como Grupo Consolidado de Investigación, con el nombre de "Grupo para el Estudio de la Respuesta Inflamatoria/Balance Oxidativo. Bases Celulares y Moleculares".

5. INTRODUCCIÓN

La EPOC se caracteriza por una limitación progresiva y poco reversible al flujo aéreo debido a la presencia de bronquitis crónica y/o enfisema. Esta enfermedad es causada fundamentalmente por una reacción anómala frente al humo del tabaco en personas susceptibles (1). La EPOC se caracteriza por una respuesta inflamatoria crónica en el tejido pulmonar. Esta enfermedad está asociada a un cambio desde una respuesta inflamatoria autolimitada, principalmente iniciada por la inhalación de humo de tabaco, a una respuesta inflamatoria crónica persistente después de una interacción prolongada con el consumo de cigarrillos. La extensión de la reacción inflamatoria está relacionada con la gravedad de la enfermedad (2).

A pesar de muchos años de investigación los procesos fisiopatológicos que llevan a una persona a desarrollar esta enfermedad están pobremente definidos. En 1977 Fletcher y Peto (3) definieron la EPOC como un proceso que se caracterizaba por una limitación crónica al flujo aéreo y un estado hipersecretor de las vías respiratorias con una fuerte relación con el consumo de tabaco. Desde entonces, la obstrucción crónica e irreversible es un distintivo común en todas las definiciones que han sido elaboradas por la British Thoracic Society, la European Respiratory Society y la American

Thoracic Society (4-6). No es hasta hace unos pocos años en los que la respuesta inflamatoria de los pulmones a partículas nocivas, en especial, al humo del tabaco, se convierte en un campo importante de investigación necesario para comprender el progreso de la enfermedad y el desarrollo de nuevas terapias para la EPOC (7). La inflamación crónica del tejido pulmonar también se asocia a efectos sistémicos. A pesar de existir un consenso general de que la inflamación crónica es un proceso característico de esta enfermedad, sorprendentemente sabemos poco de lo que concierne a los mecanismos patogénicos que subyacen.

En los últimos años pocas enfermedades han supuesto un problema de salud pública mundial equiparable al de la EPOC. La incidencia y prevalencia de esta enfermedad ha aumentado en los últimos años. Esta enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias y del tejido pulmonar, tiene asociada una elevada morbimortalidad, de tal modo que, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), causa la muerte a casi tres millones de personas cada año (8). Así, en la actualidad, la EPOC se sitúa como la quinta causa de muerte en España y en el resto del mundo, únicamente por detrás de las enfermedades coronarias, las cerebro-vasculares y las neoplasias, pero la OMS advierte de que en el 2020 ya se habrá convertido en la tercera causa de defunción y en la quinta enfermedad más frecuente. Además, a ello debemos añadir las repercusiones

laborales, sanitarias y socioeconómicas de esta enfermedad. En nuestro país la EPOC ocasiona un 35% de las incapacidades laborales definitivas y es responsable de un 7% de los ingresos hospitalarios, lo que la convierte en un auténtico problema de salud pública (9-11).

La EPOC ha sido reconocida como una enfermedad heterogénea (12). Comprende una variedad de manifestaciones tales como bronquitis, bronquiolitis y enfisema (13). Los cambios inflamatorios están presentes en la vías aéreas proximales (14) así como en las periféricas y el parénquima pulmonar (15). Estudios realizados sobre pulmones extraídos después de una cirugía torácica o postmortem de pacientes con EPOC, indican que los bronquiolos son el principal lugar donde se localiza la obstrucción de las vías aéreas (16,17). Sin embargo, el enfisema también puede contribuir a la limitación al flujo aéreo (18). Tanto la bronquiolitis como el enfisema pueden estar ambos presentes en los pacientes con EPOC y su contribución relativa a la obstrucción al flujo aéreo varía de un paciente a otro.

La tos y expectoración que definen la bronquitis crónica es el resultado de una respuesta inmune innata a partículas tóxicas y gases inhalados cuyo principal origen es el humo de tabaco. En la bronquitis crónica existe una inflamación del epitelio de las vías aéreas centrales y de las glándulas productoras de moco (19). Esta inflamación de las vías aéreas se asocia con un incremento en la producción de moco,

disminución del aclaramiento mucociliar y un incremento de la permeabilidad de la barrera epitelial. Todavía no es segura la contribución de la hipersecreción de moco a la limitación al flujo aéreo en la EPOC, parece que contribuye poco en los estadios iniciales de la enfermedad, puesto que la producción de moco en fumadores con función pulmonar normal no parece que pueda predecir el posterior desarrollo de la EPOC (20). Sin embargo, la hipersecreción mucosa podría contribuir en el estadio último de la enfermedad debido a un incremento en el número de exacerbaciones que es posible que acelere la caída del FEV₁. La hipersecreción crónica de moco puede ser un reflejo de la respuesta inflamatoria de las glándulas submucosas (21). Las células inflamatorias liberan proteasas que son potentes secretagogos de moco (22). Los oxidantes derivados del humo del tabaco y liberados por los leucocitos también se han relacionado con la producción de moco (23).

El enfisema se define como un aumento de los espacios aéreos distales, más allá de los bronquiolos terminales, causados por la destrucción de las paredes alveolares (24). La destrucción del tejido pulmonar reduce el flujo máximo espiratorio al disminuir las fuerzas de retracción elásticas. El enfisema centrolobular o centroacinar es el tipo de enfisema que más se asocia al consumo de tabaco. El

enfisema panlobular o panacinar, que se relaciona más con una deficiencia de α_1 -antitripsina, resulta en una destrucción y dilatación aún mayor de todo el acino. Se ha sugerido que tanto uno como otro están presentes en la enfermedad grave y el tipo centroacinar se asociaría más con la obstrucción grave de las pequeñas vías aéreas (25). Sólo el 40% de los fumadores con un elevado consumo de tabaco desarrollan una destrucción importante del parénquima pulmonar debido al enfisema aunque también se ha descrito la existencia de enfisema en algunos pacientes que tienen una función pulmonar normal (26).

La región en la que se localiza la mayor obstrucción en la EPOC son las pequeñas vías aéreas de conducción, menores de 2 mm de diámetro (15). Existen estudios que han demostrado que hay anomalías estructurales en las pequeñas vías aéreas en fumadores sin EPOC. La inflamación y la fibrosis peribronquial contribuyen a una obstrucción permanente de las pequeñas vías aéreas y a la destrucción de los anclajes alveolares sobre las paredes alveolares de las pequeñas vías aéreas que también pueden contribuir a la limitación al flujo de aire (19).

Aunque siempre predomina una entidad sobre la otra, con mucha frecuencia ambos tipos de EPOC aparecen entremezclados y muchas veces es difícil clasificar al paciente en bronquitis crónica o

enfisema. La falta de uniformidad, en base a alteraciones histológicas y mecanismos patogénicos diferentes, dificulta el estudio de esta enfermedad ya que no se comporta como una entidad única. Esta falta de uniformidad se ve reflejada en las manifestaciones clínicas de los pacientes pudiendo encontrar para valores similares de FEV1 diferentes patrones de deterioro funcional, manifestaciones clínicas, respuestas terapéuticas, número de exacerbaciones y calidad de vida.

Los investigadores llevan años estudiando las diferencias fisiopatológicas entre los distintos fenotipos de pacientes con EPOC. Estas investigaciones se han basado en el estudio de las diferencias histológicas y funcionales. Las características fisiológicas del enfisema difuso son secundarias a la pérdida de tejido conectivo que afecta tanto a las fuerzas de retracción elástica y al área de superficie pulmonar que está disponible para el intercambio de gases. Las fuerzas de retracción elásticas disminuyen al máximo en el enfisema panacinar mientras que la pérdida de superficie alveolar ocurre tanto en el enfisema centroacinar como en el panacinar. Esto supone un cierre prematuro de las vías aéreas durante la espiración pero no durante la inspiración. Esto lleva a un aumento de la capacidad residual funcional, disminuyendo la capacidad inspiratoria y alteraciones en la mecánica respiratoria, empeorando con el

ejercicio. Durante la espiración se produce el cierre de las vías aéreas a volúmenes pulmonares altos traduciéndose en atrapamiento aéreo e hiperinsuflación pulmonar (27-32).

A su vez, en pacientes con predominio de enfisema la difusión de monóxido de carbono (CO) corregida para volumen alveolar (VA) está disminuida comparado con los pacientes con predominio de bronquitis crónica en los que no se encuentra alterada (Tabla 1).

En la actualidad, la principal hipótesis para explicar el daño en el parénquima pulmonar y en las vías aéreas se basa en la respuesta inflamatoria y el aumento del estrés oxidativo, tanto a nivel local como sistémico (33). El resultado final es la limitación al flujo aéreo debido a la lesión de la pequeña vía aérea (bronquiolitis obstructiva) y a la destrucción y pérdida del parénquima pulmonar (enfisema). Varias técnicas se han utilizado para el estudio y posible cuantificación de la inflamación. Se han utilizado técnicas invasivas como la fibrobroncoscopia con biopsia de la pared bronquial y/o lavado broncoalveolar (34) con análisis del componente celular y de los marcadores solubles. El análisis del esputo inducido, una técnica menos invasiva, ha sido origen de muchas investigaciones con la misma finalidad (35). Se han analizado también los marcadores inflamatorios en plasma (36) y orina (37), que probablemente reflejan mejor la inflamación sistémica que la pulmonar. Recientemente se ha

centrado la investigación en el estudio del condensado de aire exhalado que constituye otra técnica complementaria completamente no invasiva que ha sido utilizada con el mismo propósito (38).

El proceso inflamatorio crónico en la EPOC difiere claramente del que vemos en el asma, con diferentes células inflamatorias, mediadores, efectos inflamatorios y respuestas al tratamiento (39).

Los estudios histopatológicos muestran que la mayor parte de la inflamación se localiza en las vías aéreas periféricas (bronquiolos) y el parénquima pulmonar. Los bronquiolos se obstruyen por la fibrosis y la infiltración de macrófagos y linfocitos T. Existe una destrucción del parénquima pulmonar y un incremento del número de macrófagos y de linfocitos T, especialmente del tipo CD8+ (40,41). Los estudios que se basan en biopsias bronquiales, lavado broncoalveolar y esputo inducido encuentran hallazgos similares y un aumento en el recuento de neutrófilos (42-44). Los eosinófilos no suelen estar aumentados excepto en las exacerbaciones o en pacientes que además tienen un asma asociado (45,46).



	Asma	EPOC-B	EPOC - A
Duración LFA	Episódica	Persistente	Persistente
Reversibilidad	Importante	A menudo presente	Escasa
CPT	N o ↑	N	↑
DLCO	N	N	↓
DLCO/VA	N	N	↓
Fuerza retracción elástica	N	N	↓
Distensibilidad	↑	↑	↑↑

Tabla 1. Diferencias funcionales entre pacientes diagnosticados de asma, EPOC con predominio de bronquitis crónica y enfisema panacinar. LFA: limitación al flujo aéreo. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. CPT: Capacidad pulmonar total. DLCO: Capacidad de difusión de monóxido de carbono. VA: volumen alveolar. EPOC-B: Pacientes diagnosticados de EPOC con predominio de bronquitis crónica. EPOC-A: Pacientes diagnosticados de EPOC con predominio de enfisema panacinar (32).

Los mediadores inflamatorios implicados en la EPOC están peor definidos que en el asma. La concentración de leucotrieno B₄ (LTB₄), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 8 (IL-8) están aumentados en el esputo de los pacientes con EPOC (44, 47). Probablemente exista una compleja interacción entre las células y los mediadores que dé como resultado los cambios progresivos en las vías aéreas y la destrucción del parénquima pulmonar. Los macrófagos parece que juegan un papel muy importante ya que son hasta 10 veces más numerosos que en una persona sana. Estas células posiblemente sean activadas por el humo del tabaco liberando LTB₄ e IL-8 que actúan como factores quimiotácticos de neutrófilos. Los macrófagos también liberan proteasas, responsables de la destrucción del parénquima pulmonar, y estimulan la secreción de moco. El papel de las células T citotóxicas no está claro, pero pueden estar implicadas en la apoptosis y destrucción de las células epiteliales que forman la pared del alvéolo mediante la liberación de perforinas y TNF- α (48).

Otra de las hipótesis que explica la destrucción del parénquima pulmonar es el desequilibrio entre proteasas y antiproteasas. Se han centrado las investigaciones en la elastasa de neutrófilos, la proteinasa 3, las catepsinas y metaloproteinasas de matriz, pudiendo todas ellas producir enfisema en los estudios de experimentación animal (49). En la EPOC el balance parece claramente estar a favor

de un incremento en la proteólisis, tanto por un aumento de las proteasas como por una deficiencia de antiproteasas (α_1 -antitripsina, elafina e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz). Se han encontrado concentraciones elevadas de metaloproteinasas de matriz en el lavado broncoalveolar así como un aumento de la actividad y expresión en macrófagos alveolares de la metaloproteinasa-1 (colagenasa) y 9 (gelatinasa B) en pacientes diagnosticados de enfisema. Incluso en modelos de experimentación animal con ratones se ha conseguido evitar el desarrollo del enfisema mediante la supresión del gen que codifica la metaloproteinasa de matriz-12. Habitualmente estas enzimas son contrarrestadas por las antiproteasas destacando la α_1 antitripsina y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz. Normalmente en los pacientes que desarrollan EPOC la producción de antiproteasas puede ser inadecuada para antagonizar los efectos de las múltiples proteasas(50-58).

Existen evidencias de que el estrés oxidativo juega un papel importante también en la patogenia de la EPOC. Se ha demostrado un aumento del peróxido de hidrógeno y del 8 isoprostano, marcadores de estrés oxidativo, en el condensado exhalado de los pacientes con EPOC, especialmente durante las exacerbaciones. El aumento del estrés oxidativo puede activar el factor de transcripción

nuclear- κ B, que activa los genes para la síntesis de TNF- α , IL-8 y otras proteínas proinflamatorias. Las especies de oxígeno reactivo (ROS) procedentes del humo del tabaco y de las células inflamatorias también van a producir daño del tejido pulmonar alterando la relación proteasas-antiproteasas, activando el factor nuclear- κ B y aumentando la producción de isoprostanos (59-63).

Actualmente se tienen más evidencias sobre la existencia de una comunicación entre los mecanismos patogénicos en el compartimiento pulmonar y el resto de tejidos, lo que nos lleva al concepto de la EPOC como una enfermedad sistémica (64). Existe un aumento en los niveles de marcadores inflamatorios (citoquinas y reactantes de fase aguda) a nivel sistémico en los pacientes con EPOC estable. En las reagudizaciones la concentración de estos marcadores tanto a nivel local como en el plasma de los pacientes con EPOC aumenta aún más que en la fase estable. Se sabe que estos niveles elevados permanecen aumentados incluso cuando las personas con EPOC dejan de fumar, si bien es cierto que, aunque no llegan a normalizarse respecto a una persona fumadora que no haya desarrollado limitación crónica al flujo aéreo, sí que disminuyen si se abandona el consumo de tabaco (77).

Aunque el curso de la inflamación está determinado por el balance entre mediadores pro y antiinflamatorios, en la EPOC se ha prestado

una especial atención a los primeros. Todavía tienen que ser aclaradas cuales son las principales causas de la inflamación sistémica en este tipo de pacientes (65).

La inflamación sistémica en los pacientes con EPOC está siendo reconocida como un factor de riesgo para una gran variedad de complicaciones que incluyen la arterioesclerosis (66), caquexia (67), anorexia (68) y osteoporosis (69). Todas estas complicaciones pueden verse en los pacientes con EPOC (70-75). En resumen, los datos que disponemos hasta el momento apoyan que la inflamación sistémica está presente en este tipo de pacientes. Estos hallazgos pueden explicar, al menos en parte, la gran prevalencia de caquexia, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares entre estos pacientes. Se ha observado también un descenso más rápido de la función pulmonar en aquellos pacientes con EPOC que presentan marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo elevados tanto a nivel local como sistémico (76). Sería bueno en futuros estudios analizar de manera prospectiva si la atenuación de la inflamación sistémica puede modificar el riesgo de estas complicaciones en los pacientes con EPOC (77).

Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento que han analizado el papel que juegan los marcadores inflamatorios y el estrés oxidativo no han tenido en cuenta los distintos fenotipos de

EPOC a pesar de que se trata de una enfermedad heterogénea con diferentes grados de afectación de la vía aérea, parénquima y repercusión sistémica. De hecho, pacientes con el mismo nivel de limitación al flujo aéreo pueden presentar diferencias en las manifestaciones clínicas, el deterioro de la función pulmonar y la comorbilidad. El clásico fenotipo de abotargado azul y de soplador rosado es una imagen real de la práctica clínica diaria, a pesar de que el grado de solapamiento a menudo dificulta el uso de estas características clínicas para guiar el cuidado de estos pacientes (78-81).

El hacer un esfuerzo para diferenciar los distintos fenotipos que forman la EPOC podría, al menos en teoría, ser de utilidad a la hora de decidir cuál es la mejor opción terapéutica, así como definir mejor la historia natural de la enfermedad. No deberíamos enfocar el manejo clínico de igual modo en un paciente con EPOC que presente un gran componente inflamatorio, con ausencia de cambios destructivos en el parénquima pulmonar y reversibilidad a la obstrucción, que en otro paciente con escaso componente inflamatorio, gran componente fibrótico y destrucción del parénquima pulmonar.

5.1 Antecedentes y estado actual del tema.

En la EPOC los mecanismos celulares son distintos a los que vemos en otras enfermedades que también cursan con limitación al flujo aéreo, como es el caso del asma (26, 82). Esta característica puede explicar, al menos en parte, porqué los fármacos antiinflamatorios, como los corticoides inhalados, no reducen la respuesta inflamatoria en pacientes con EPOC. Una mejor comprensión o conocimiento del proceso inflamatorio que subyace a esta enfermedad permitiría un uso más racional de la terapia así como el desarrollo de nuevos fármacos.

El interés en el conocimiento de los marcadores inflamatorios en la EPOC ha aumentado en los últimos años. Las características que debe cumplir un marcador ideal son las siguientes: a) identificar a aquellos pacientes que son más susceptibles de desarrollar la enfermedad; b) reflejar el grado de inflamación pulmonar, así como la gravedad; c) ser reproducible en condiciones clínicas estables; d) ser fácil de obtener (no invasivo) lo que permite múltiples mediciones en estudios longitudinales; e) ser útil para monitorizar la respuesta al tratamiento; f) y de valor pronóstico.

Monitorizar la inflamación puede ser de utilidad en el seguimiento de los pacientes con EPOC y para guiar el tratamiento. Para el estudio de la inflamación en las enfermedades pulmonares se han utilizado

técnicas como el estudio de lavado broncoalveolar y/o de biopsias obtenidas a través de un broncoscopio. El problema de estas técnicas es que son invasivas, pudiendo artefactar el resultado del análisis. El análisis del esputo inducido también se ha utilizado aunque podría ser definida como una técnica semiinvasiva al introducir en la vía aérea una solución salina que podría desencadenar por sí misma una reacción inflamatoria. Otros métodos como el análisis de marcadores inflamatorios en el plasma y orina podrían encontrar cambios determinados por las manifestaciones sistémicas de la enfermedad más que reflejar inflamación de las vías aéreas (83).

El estudio de los marcadores inflamatorios en el aire exhalado han tenido un gran interés en los últimos años, puesto que se trata de una prueba no invasiva en la que los resultados no pueden ser artefactados por el uso de fármacos (por ejemplo anestésicos), agentes mecánicos (pinza de biopsia), o químicos (suero salino hipertónico). Se han analizado sustancias contenidas tanto en la fase volátil (NO, CO, N₂), como en la fase líquida. El término recomendado para la fase no volátil es el de condensado de aire exhalado (CAE). La medición del óxido nítrico (NO) ha demostrado ser de utilidad en los pacientes con asma para monitorizar la inflamación en la vía aérea, pero su utilidad es dudosa en los pacientes diagnosticados de EPOC, ya que la mayoría de estos pacientes son fumadores activos y

se sabe que las personas que fuman presentan niveles elevados de NO. EL CAE está formado principalmente por vapor de agua pero también contiene partículas aerosolizadas (83-89).

El análisis de los marcadores inflamatorios en el CAE puede ser de utilidad para monitorizar la inflamación de los pacientes con EPOC (90). Al ser un método no invasivo puede ser adecuado en los estudios longitudinales y para valorar la respuesta a la terapia farmacológica. El análisis de determinados marcadores inflamatorios puede ser de utilidad en el diagnóstico diferencial de algunas enfermedades inflamatorias del pulmón, así como para fenotipar distintos grupos dentro de una misma entidad nosológica. Sin embargo, esta técnica todavía no es de utilidad en la práctica clínica ya que todavía existen aspectos metodológicos que deben ser aclarados y validados.

Al realizar el análisis del condensado hay varios factores que deben tenerse en cuenta: el primero es que la concentración de sustancias es muy baja, el segundo es que su composición es muy compleja, y desconocemos la proporción de marcadores que corresponden al tracto respiratorio inferior, y a su vez cuales de estos componentes pueden interaccionar químicamente, descomponerse y formar nuevos productos (91).

Otro aspecto a tener en cuenta es que debemos predefinir el marcador que queremos estudiar, ya que, hasta la fecha, no existe ningún sistema que nos permita realizar un análisis completo de todas las sustancias no volátiles que forman parte del CAE. Las técnicas de ELISA han demostrado ser válidas en suero para el estudio de los diferentes productos del metabolismo del ácido araquidónico, como las prostaglandinas y los leucotrienos, sin embargo, los valores hallados en el CAE en diferentes estudios se encuentran muy cercanos al umbral de detección.

La mayor ventaja de este sistema es que el condensador es relativamente barato y los reactivos están disponibles en la mayoría de los laboratorios. No obstante, hay diferencias considerables en la calidad de los reactivos de los distintos fabricantes, e incluso en los distintos lotes de un mismo producto. Como norma general podemos decir que la mayoría de los equipos de inmunoanálisis disponibles son sólo parcialmente adecuados para el análisis del CAE. Para mediciones totalmente fiables, especialmente si queremos estandarizar el método, se debe usar la espectrometría de masas o la cromatografía de gas o líquido (GS/MS o LC/MS).

En los últimos años se han hecho esfuerzos para estandarizar la técnica habiéndose duplicado el número de publicaciones sobre el condensado de aire exhalado cada año desde 1999 y recientemente

se han elaborado unas recomendaciones metodológicas por las Sociedades Europea de Respiratorio y de Tórax Americana (92).

5.2 Fundamentos de la técnica

La obtención de muestras del condensado del aire espirado es muy sencilla, independientemente de que se trate de un dispositivo comercializado o casero. El mecanismo de acción es muy similar en todos los dispositivos y puede resumirse como detallamos a continuación. El paciente tiene que respirar a través de un dispositivo bucal o mascarilla facial como lo hace normalmente, es decir, a volumen corriente. El sistema está formado por dos válvulas unidireccionales, una que permite la inspiración y otra la espiración, evitando así la reinhalación del aire espirado. El aire pasa a través de un tubo que conecta la boquilla con el condensador. El aire que penetra en el condensador es enfriado a temperaturas por debajo de los cero grados condensándose el vapor de agua y depositándose en las tuberías de conducción del condensador. El aire circulante que no es condensado abandona el condensador a través de una válvula unidireccional. El material obtenido se recupera al finalizar la prueba, depositándose el material recogido en un sistema de almacenamiento, tanto en fase sólida (hielo) como líquida. La muestra obtenida es dividida inmediatamente en alícuotas para su posterior análisis e inmediatamente son congeladas a

temperaturas inferiores a -20°C , siendo recomendables -70 a -80°C para evitar que los componentes volátiles de las muestras se alteren.

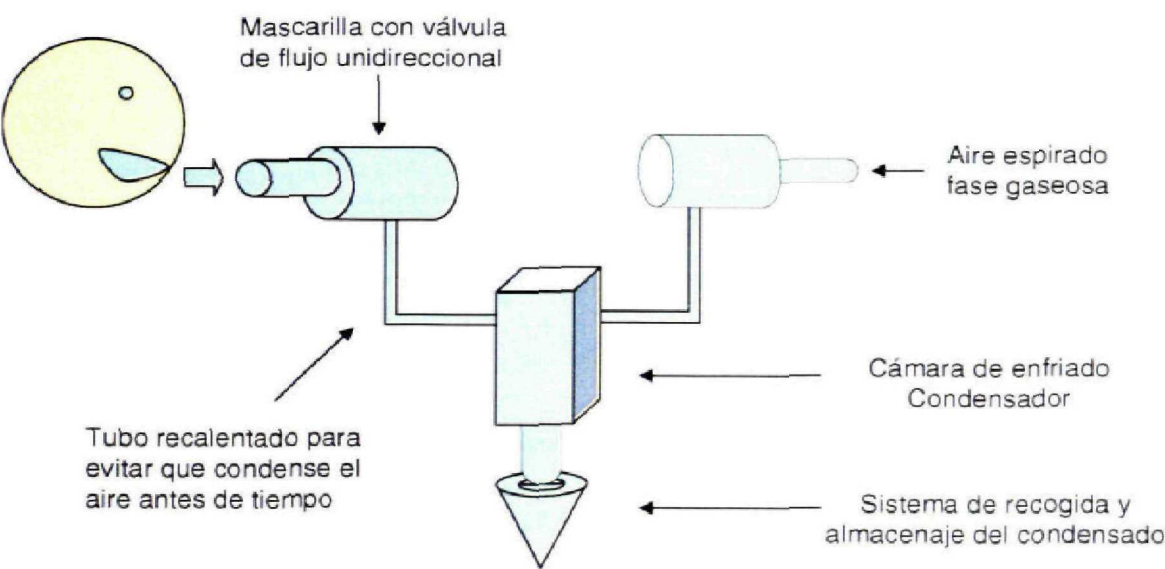


Figura 1: Representación esquemática del sistema de recogida del condensado exhalado de gases

Los condensadores pueden dividirse en dos grandes grupos: comerciales y caseros. Existen varias diferencias en el diseño de estos equipos, en el material de las tubuladuras y los sistemas de almacenamiento (teflón o propietileno), la longitud y diámetro de los

sistemas de conducción, la existencia de cámaras de cristal de doble pared y el sistema de refrigeración que puede ser hielo seco o húmedo, nitrógeno líquido, aire frío o metal. (92)

Los dispositivos comercializados, como el de Jaeger, no han demostrado que sean mejores que los caseros y son mucho más caros. Los datos publicados son similares utilizando ambos sistemas (83). En un estudio realizado que comparaba un dispositivo casero (Tubuladura de tygon sumergida en hielo) con un dispositivo comercializado (tubuladura de metal laminado recubierta de teflón refrigerado a -20°C) no se encontraron diferencias en la medición de moléculas malonildialdehído (MDA), hexanal, heptanal o nonanal (93). Otro punto en contra de los dispositivos comercializados es el coste económico que limita su uso a unos pocos laboratorios.

Sobre el origen del condensado existen evidencias que sugieren que las sustancias no volátiles del tracto respiratorio inferior pueden ser transportadas en el aire exhalado en forma de aerosol. Sin embargo, no se conoce de forma precisa el mecanismo por el cual pequeñas cantidades del fluido que recubre la vía aérea son aerosolizadas durante la respiración. Posiblemente está en relación con la turbulencia que se genera en ciertos sectores del árbol traqueobronquial y/o con la apertura brusca de los bronquiolos respiratorios y alvéolos durante la inspiración (92, 94). Es necesario

tener en cuenta que ciertas enfermedades pueden alterar el volumen y la viscosidad del fluido, así como el calibre y turbulencia en la vía aérea (95) (figura 2).

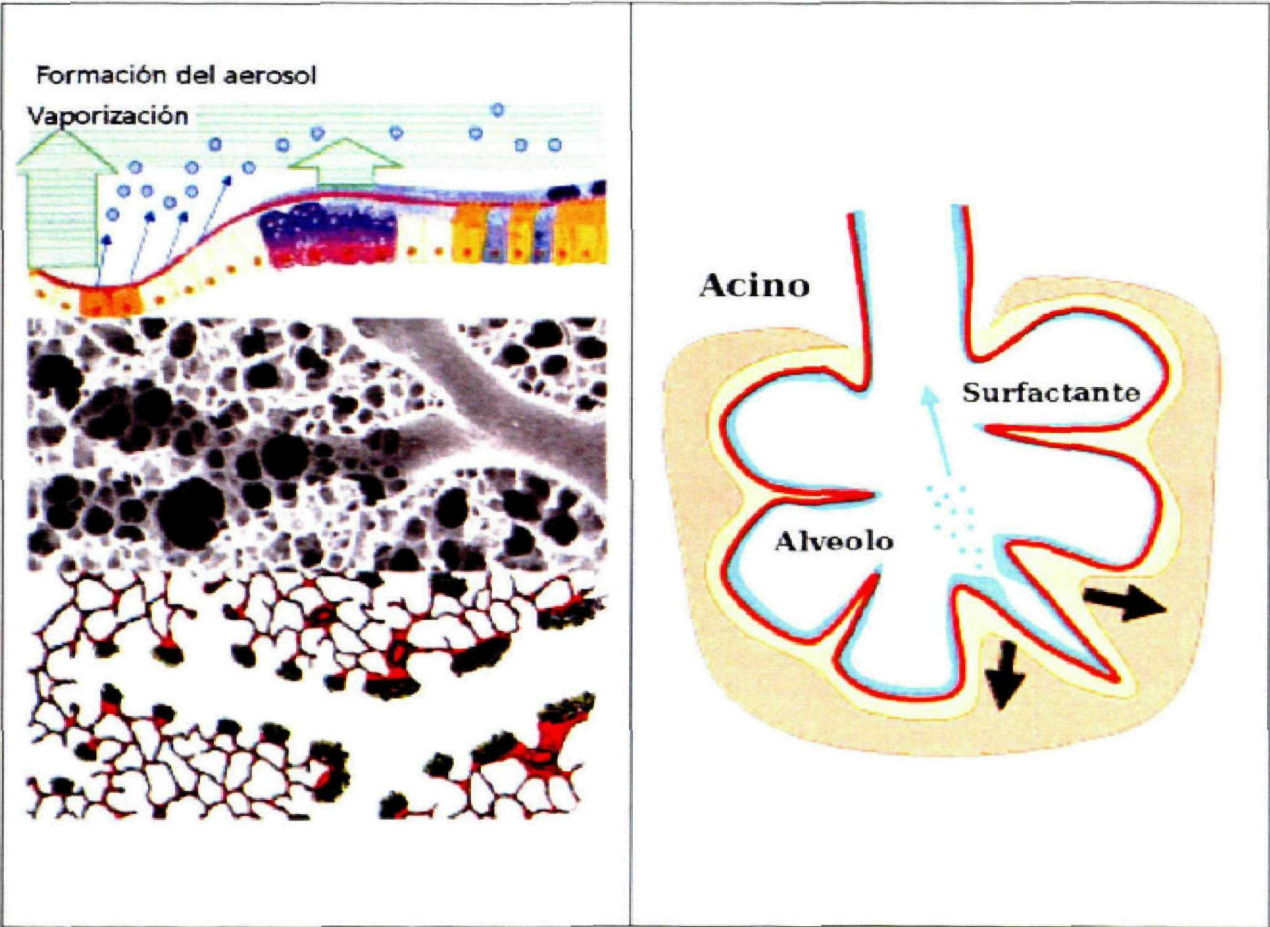


Figura 2. Esquema que representa la adhesión de moléculas no volátiles de la superficie de las vías aéreas a la corriente cargada de vapor de agua que circula a través de las vías aéreas.

El condensado está formado por varios componentes, siendo el principal componente el vapor de agua que representa el 99% de la muestra obtenida. Sólo una pequeña parte del condensado contiene moléculas no volátiles. Durante la obtención del CAE el aire espirado pasa a través de un refrigerador, enfriando el vapor de agua y obteniendo una fase líquida o sólida dependiendo de la temperatura alcanzada. Por el momento se desconocen los mecanismos por los que las sustancias no volátiles son añadidas al condensado.

Existen pocos trabajos publicados sobre la procedencia de las moléculas que forman parte del condensado. Se desconoce qué proporción de marcadores corresponde al tracto respiratorio inferior (tráquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos), ya que algunas de las sustancias analizadas también se encuentran presentes en el tracto respiratorio superior. Se ha demostrado que las concentraciones de peróxido de hidrógeno dependen del flujo de aire lo que sugiere que en parte se originan en las vías de conducción (96). Esto no se ha demostrado en los niveles de adenosina, MDA, ni de pH en el condensado(97). Se han realizado estudios en los que se mide la concentración de la urea y otros electrolitos estimando que el fluido respiratorio representa entre el 0.01% y el 2% del volumen total del condensado (98-99). Otros estudios han comparado muestras obtenidas utilizando un dispositivo bucal con y sin pinzas nasales, no

encontrando diferencias significativas en las concentraciones de adenosina, tromboxano B₂ y valores del pH (100,101). En otros estudios que comparaban muestras obtenidas a través de un traqueostoma y otras respirando por la boca encontraron niveles similares de peróxido de hidrógeno y de 8 isoprostano (102-104). Estos resultados sugieren que el origen de los productos no volátiles son las vías aéreas inferiores, al menos para este tipo de moléculas. No obstante, las concentraciones de amonio eran menores en las muestras obtenidas a través de un traqueostoma lo que sugiere que gran parte del amonio procede de las vías aéreas superiores u orofaringe. Así pues, el origen variará dependiendo de la molécula que estudiemos, no pudiendo estar seguros al 100% de que su origen es pulmonar, pudiendo influir en los resultados enfermedades de la boca y nasofaringe. Los resultados de las mediciones del pH también pueden verse alterados en aquellos pacientes que padecen reflujo gastroesofágico.

5.3 Factores que influyen en la obtención del condensado

Algunos autores han propuesto el uso de pinzas nasales para minimizar al máximo una posible contaminación de la muestra por marcadores procedentes de la nasofaringe argumentando que durante la inhalación a través de la nariz el aire es humidificado en las vías aéreas superiores y los marcadores que se originan en la nariz o

en los senos es más probable que entre en las vías aéreas inferiores. En estudios realizados en personas sanas comparando ambos métodos no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de adenosina, tromboxano B2 y amonio (100). En pacientes con inflamación de la vía aérea superior se encontraron concentraciones mayores de adenosina en aquellos pacientes en los que se recogió la muestra inhalando a través de la nariz y exhalando a través de la boca que en aquellos que inhalaban y exhalaban a través de la boca (100). El uso de pinzas nasales puede prevenir la inhalación o exhalación de aire por la nariz y por tanto el riesgo de que la muestra se contamine.

El uso de una resistencia mientras se realiza también puede ser de utilidad según algunos autores ya que hace que el paladar blando cierre la comunicación con la nasofaringe evitando que el aire arrastre los mediadores presentes en la nariz y en los senos nasales. Por un lado, el uso de pinzas nasales como ya comentamos previamente puede minimizar la aerosolización de partículas procedentes de la nasofaringe, pero los gases que se forman en esta zona, como es el caso del óxido nítrico (NO) pueden ser arrastrados en el aire exhalado a pesar del uso de pinzas nasales si no utilizamos una resistencia. Sin embargo, el uso de una resistencia entre el sujeto y el condensador implicaría un mayor esfuerzo por parte del paciente y durante la

inspiración el velo del paladar no permanecería cerrado, lo que evitaría una posible contaminación de la muestra. Un grupo que utilizó una resistencia encontró una mejor reproducibilidad en la medición de nitritos (118). Sin embargo en la última revisión del tema todavía no recomiendan el uso de una resistencia para cerrar el velo del paladar (92).

Debido a lo que previamente hemos argumentado, desde el punto de vista técnico, antes de comenzar con la recogida, el sujeto debe estar en reposo durante 15 minutos, debemos limpiar la nariz de secreciones y enjuagar la boca para evitar en la medida de lo posible la contaminación de la muestra por mediadores procedentes de la nasofaringe. Durante la realización de la prueba el paciente debe evitar toser, tragar saliva o eructar para minimizar al máximo el riesgo de contaminación de la muestra recogida (83).

Potencialmente la saliva también puede contaminar la muestra. Se han realizado estudios que han medido los niveles de amilasa en el condensado sin encontrar diferencias significativas si se realiza correctamente la técnica (83, 92, 108). Para controlar la contaminación salival, no se deben usar filtros, aunque sí dispositivos que permitan atrapar la saliva y medir los niveles de amilasa en el condensado (98).

El principal determinante para la obtención del condensado es el volumen de ventilación por unidad de tiempo. Suele ser suficiente con respirar normalmente, a volumen corriente, durante 10-20 minutos. La duración de la prueba es de 10-15 minutos en adultos, para obtener 1-3 cc de condensado, y de 15-20 minutos en niños (38). La temperatura y la humedad del aire exhalado también influyen en la cantidad de muestra recogida, requiriendo que estos parámetros sean constantes en el sitio en que utilicemos el condensador.

La duración recomendada de la prueba es de 10 minutos, ya que es tiempo suficiente para obtener 1 a 2 mL de condensado y la mayoría de las personas toleran este periodo de prueba sin cansarse. En aquellos estudios en los que se necesite una mayor cantidad de muestra el tiempo de recogida deberá prolongarse. Comparando estudios en los que el tiempo de recogida variaba (10, 15 y 20 minutos) no se han encontrado diferencias en los niveles de pH, H₂O₂, nitratos, nitritos, 8-isoprostano, adenosina y MDA (92). Algunos autores han encontrado que no sólo existe una relación lineal entre el volumen de condensado recogido y el volumen espirado, sino también con la concentración de proteínas y urea, lo que sugiere que estos compuestos se acumulan en el depósito del condensador de un modo muy similar al vapor de agua espirado. Sin embargo, esta distribución constante no tiene porqué ser igual con otras

sustancias (92).

El que exista una gran variabilidad en la muestra obtenida, incluso si la duración de la prueba es similar, sugiere que otros parámetros respiratorios pueden influir como son la frecuencia respiratoria, la ventilación minuto y el volumen corriente, además de la temperatura, la humedad ambiente y la turbulencia del flujo dentro de la vía aérea (83)

La temperatura es un factor muy importante no sólo en la recogida sino también en la conservación de las muestras. Por un lado, la temperatura que es capaz de alcanzar el condensador influirá en la forma física en que el material es recogido e influye en la estabilidad de los componentes del condensado. Cuando el vapor de agua se condensa alrededor de los 0° C la muestra es recogida en fase líquida. Aquellos condensadores que permiten alcanzar temperaturas más bajas (-10 a -20°C) obtienen la muestra en fase sólida (congelada). No obstante, hay que tener en cuenta que el aire que penetra en el condensador calienta la superficie de las tubuladuras y esto influye en la temperatura final que es capaz de alcanzar el condensador. La temperatura influye en la solubilidad y estabilidad de los mediadores volátiles y de otras sustancias como los leucotrienos, purinas y amonio. La inconsistencia en la forma física de la muestra (líquida, congelada o mixta) pudiera explicar, al menos en

parte, la amplia variabilidad en las concentraciones de mediadores inflamatorios, sobre todo en los compuestos más inestables. Otro problema es que la muestra, incluso si es recogida totalmente o parcialmente congelada, necesita ser derretida inmediatamente después de haber sido recogida para separarla en suficientes alícuotas si se va a analizar más de una molécula, para inmediatamente después ser almacenado a temperaturas muy bajas en el menor tiempo posible. Hay que tener en cuenta que la estabilidad de la sustancia en la muestra recogida no puede ser comparada con su durabilidad en una solución pura. En la tabla 1 se recoge la vida media, a una temperatura de $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$, de algunos biomarcadores.

El aire ambiente contiene moléculas que pueden interaccionar e influir en la composición del condensado, pudiendo ser añadidas nuevas moléculas o interaccionar con el resto de sustancias alterando, al menos en potencia, la composición del condensado. Se ha demostrado que el NO presente en la atmósfera reduce los niveles de H_2O_2 (105). Por otro lado, las muestras que deben ser descongeladas durante un corto periodo de tiempo para dividirla en alícuotas pueden interaccionar con el aire ambiente si se dejan expuestas al mismo. Esto puede alterar la concentración de mediadores si la molécula de interés que queremos estudiar está

también presente en el aire ambiente en forma de molécula activa o de precursor. Por estos motivos no es recomendable que la muestra se deje fuera a temperatura ambiente una vez que ha sido recogida y dividida, no sólo porque pueda existir una interacción con el aire, sino porque las sustancias que forman parte del condensado pueden interaccionar y ser degradadas o formadas a mayor velocidad a esta temperatura.

Los nuevos condensadores deberían ser diseñados para medir todos estos parámetros respiratorios, así como, deberían automatizar la recogida de muestras, separando las alícuotas y congelándolas. Se ha argumentado la posibilidad de incorporar sensores que permitan analizar el pH o el H_2O_2 de la muestra justo después de su obtención, esto ayudaría en la aplicabilidad de esta técnica a la práctica clínica. Actualmente se está investigando esta misma posibilidad para otros mediadores inflamatorios, sin embargo, debido al alto coste económico es poco probable que este método pueda ser aplicado a la clínica.

El patrón respiratorio puede ser importante a la hora de analizar los resultados. Se sabe que puede influir en los resultados de otras técnicas, como es el caso del análisis del NO exhalado, también influye en los niveles de H_2O_2 , a mayor flujo espiratorio menor es la concentración de H_2O_2 , pero a flujos bajos (respirar a volumen

corriente) este efecto es menor. (96). Como previamente comentamos existe una fuerte correlación entre el volumen respirado y el volumen de condensado recogido. Actualmente, no disponemos de datos acerca del patrón respiratorio y la concentración de mediadores en el condensado (92). Por otro lado, la obtención del condensado no influye en las pruebas de función pulmonar ni en la detección del NO exhalado (86).

Actualmente no disponemos de evidencias de que la alteración en los parámetros de función pulmonar modifiquen el volumen total recogido o la dilución de mediadores inflamatorios en el condensado (106). El único estudio realizado analizaba el efecto de la broncoconstricción inducida con metacolina sobre el pH del CAE no encontrando diferencias antes y después de la broncoprovocación (101).

Se disponen de escasos datos sobre cómo la edad y el sexo influyen en la concentración de los mediadores y el volumen de la muestra recogida. Existen datos sobre los niveles de H₂O₂ que son más elevados en adultos que en niños, no interfiriendo sobre la concentración de este parámetro la altura y el peso. Tampoco se dispone de datos sobre el potencial efecto que pudiera tener la raza (92).

A pesar de que no se dispone de evidencias sobre el efecto de ciertas comidas y bebidas en la concentración de mediadores, se recomienda realizar la prueba en ayunas o al menos no haber comido ni bebido algunas horas previas a la prueba.

No disponemos de estudios prospectivos que confirmen o descarten alguna variación diurna en la concentración de mediadores o en la cantidad de condensado recogida. Se conoce que el ritmo circadiano influye en ciertos compuestos como el H_2O_2 , tanto en sujetos normales como en pacientes con EPOC. Esto no ha sido confirmado para el pH.

El consumo de tabaco, en forma de cigarrillos, aumenta los niveles, en sujetos sanos, de H_2O_2 , isoprostano, nitritos y nitrotirosina, sin embargo, esto no ha sido demostrado en el análisis de otras moléculas como es el caso de la IL-1b y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). En pacientes asmáticos también se ha confirmado que tras una exposición reciente al humo del tabaco de cigarrillos los niveles de H_2O_2 estaban elevados. Con todo en pacientes diagnosticados de EPOC no se observaron diferencias entre los fumadores y no fumadores en los niveles de H_2O_2 y 8 isoprostano. No obstante, a la hora de realizar la recogida del condensado se recomienda que los pacientes no fumen durante al menos 4 horas antes de la ejecución de la prueba (92).

explicación que dan a esta variabilidad se basa en los cambios en la dilución y la variabilidad en los resultados de algunas de las técnicas de análisis analizadas. La mayoría de las técnicas que se utilizan para cuantificar los biomarcadores fueron diseñadas para el análisis de estas sustancias en el plasma, siendo la concentración de biomarcadores mucho más baja en el condensado, rozando en algunos casos los límites de detección. Los estudios que se han realizado para analizar la dilución de los marcadores en el condensado no han sido concluyentes poniendo de manifiesto una vez más la variabilidad de esta técnica. Además, hay que tener en cuenta que la variabilidad intra e interanálisis de estos métodos es grande. Debido a esto varios autores han postulado que aumentar la sensibilidad de los sistemas de detección podría ser útil para reducir la variabilidad. Otra posible opción sería concentrar las muestras mediante técnicas como el liofilizado, pero existe el riesgo de que las sustancias volátiles, semivolátiles y las sustancias inestables puedan perderse durante el proceso.

Existe el riesgo añadido de contaminación salival si bien es cierto que los análisis del condensado muestran la presencia de moléculas no presentes en la saliva y la concentración de electrolitos es diferente a la de la saliva (108). Esta información sugiere que la saliva no es el origen principal del condensado. Sin embargo, la saliva contiene

muchos de los mediadores que están también presentes en las vías aéreas inferiores y es razonable pensar que exista algún intercambio entre componentes de la saliva y de las vías aéreas, esto es especialmente importante en aquellos componentes que se encuentran a altas concentraciones en la saliva, incluyendo las sustancias volátiles. Por esta razón debe excluirse contaminación salival cuando se recoge el condensado. Para evitar la contaminación salival puede utilizarse un atrapador de saliva, poniendo el condensador a una altura mayor que la boca haciendo menos probable que la saliva pueda entrar en el dispositivo de recogida y separando la pieza bucal del condensador alargando el tubo. La detección de amilasa salivar es una técnica común para excluir contaminación salivar en el condensado. Numerosos estudios han demostrado que si se tiene cuidado para evitar la contaminación salivar sólo se detecta amilasa en un escaso número de muestras y en concentraciones muy inferiores a las detectadas en la saliva.

5.4 Seguridad de la técnica

La recogida del condensado ha demostrado ser una técnica fácil y segura. En más de 10.000 pruebas realizadas en diferentes laboratorios de función pulmonar no se ha informado de efectos adversos. Tampoco la realización de esta prueba altera los resultados

de otras pruebas que estudian la función pulmonar ya que el paciente respira a volumen corriente durante toda la prueba, siendo este patrón respiratorio mucho más seguro que el de realizar una prueba de FVC que puede desencadenar un episodio de broncoespasmo. Otro problema es el riesgo de contagio de enfermedades infecciosas, de ahí la importancia de lavar correctamente después de la realización de la prueba las tubuladuras externas, internas, así como, las válvulas unidireccionales que eviten la reinhalación desde el condensador y el uso de boquillas desachables. A estas medidas se podría añadir un filtro de partículas que evitase la contaminación de las tubuladuras, sin embargo, esto no se recomienda en el momento actual, pues podría artefactar los resultados de la muestra ya que cierto tipo de moléculas volátiles podrían terminar atrapadas en el filtro. Hemos de tener especial cuidado con los componentes de limpieza que utilizamos, ya que pueden destruir los mediadores que queremos analizar y una limpieza con productos inadecuados puede interferir en análisis posteriores del condensado. Recientemente en la última revisión del tema se recomienda no utilizar este tipo de filtros, así como tener especial cuidado en la desinfección de los dispositivos (92).

5.5 Almacenamiento de las muestras

Debido a que la mayoría de las moléculas no pueden ser analizadas

en el momento de la recogida a excepción del pH y el H_2O_2 , las muestras han de ser almacenadas antes de que podamos medir los mediadores. Es recomendable que sean congeladas inmediatamente a -70°C después de la recogida de las muestras. También se recomienda que la muestra sea dividida en alícuotas para evitar múltiples ciclos de congelado y descongelado que podrían alterar o destruir algunos mediadores, tales como las prostaglandinas, leucotrienos y H_2O_2 .

El análisis debe ser realizado en el intervalo de tiempo en que se sabe que el biomarcador permanece estable. No existen estudios que comparen análisis de muestras recogidas inmediatamente y aquellas que fueron congeladas para su posterior análisis (92).

5.6 Medición de los biomarcadores no volátiles en el condensado

Los estudios del CAE han aumentado notablemente en los últimos años. Se han analizado numerosos biomarcadores que abarcan desde el pH a productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico que parece que juegan un papel de especial relevancia en la reacción inflamatoria.

La medición de la acidez (pH) del condensado también ha demostrado ser un marcador de utilidad. Para su medición se han

utilizado pH-metros. En sujetos estables el pH del condensado medido inmediatamente después de obtener la muestra tiende a ser inestable, por ello, algunos autores han recomendado gasear la muestra con un gas que no contenga CO₂, como el helio, para eliminar el CO₂ y favorecer la estabilidad de las lecturas (83, 92, 109). No obstante, esta postura no es defendida por todos ya que estamos manipulando la muestra y al mismo tiempo que eliminamos CO₂ podemos estar eliminando otra serie de biomarcadores importantes. El pH del fluido que recubre las vías aéreas parece estar relacionado con el metabolismo de neutrófilos y por tanto con el proceso inflamatorio, y puede ser indicativo del estado inflamatorio de las vías aéreas (109). Valores disminuidos de pH en el condensado parecen también estar relacionados con la broncoconstricción (110), la disminución de la movilidad ciliar (111), el aumento de la viscosidad de la mucosidad de las vías aéreas (112) y con daños en el epitelio de las vías respiratorias (113). Las investigaciones sobre el pH del condensado han demostrado que en los pacientes con EPOC los niveles están descendidos si se compara con un grupo control de personas sanas ya sean fumadores o no fumadores. Se ha visto que los niveles permanecen bajos incluso en aquellos pacientes con EPOC que dejaron de fumar hace tiempo, lo que indica que el componente inflamatorio persiste en estos sujetos. Tampoco se han encontrado diferencias entre los pacientes EPOC sin tratamiento con

corticoides inhalados y los que sí reciben este tratamiento. En este tipo de pacientes también se ha encontrado que los niveles de pH se correlacionan con el recuento de neutrófilos en el esputo y la concentración de H_2O_2 exhalado (109). En los pacientes fumadores sanos también se demuestra que los niveles del pH del condensado son más bajos que los de las personas sanas no fumadoras, incrementándose los valores del mismo si la persona deja de fumar y no ha desarrollado la enfermedad.

Muchos trabajos publicados se han centrado en el estudio marcadores del estrés oxidativo, como el peróxido de hidrógeno H_2O_2 o los prostanoïdes, y de marcadores inflamatorios como son los eicosanoides que son productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico (AA). Esto implica el estudio de los leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) y tromboxanos (Tx). A continuación resumimos los datos aportados por los estudios de mayor relevancia.

Se han detectado niveles aumentados de H_2O_2 en el condensado de pacientes con EPOC estable respecto a un grupo control de sujetos sanos. Al recibir tratamiento con corticoides inhalados se objetivó un descenso en los niveles de H_2O_2 , después de un periodo de lavado de 4 semanas sin tratamiento el efecto de los corticoides inhalados persistía. En las exacerbaciones de la EPOC los niveles de H_2O_2 aumentan y se correlacionan con el recuento diferencial de

eosinófilos en el esputo inducido. Existe una correlación negativa entre los niveles de H_2O_2 y el FEV_1 (114,115).

Los leucotrienos son eicosanoides (derivados del metabolismo del ácido araquidónico) formados por acción primaria de la lipooxigenasa-5. El LTB_4 actúa como mediador inflamatorio y quimiotáctico, estimula la formación de radicales libres y la formación y liberación de enzimas lisosómicas por parte de los neutrófilos. (116,117). Los niveles de LTB_4 se encuentran elevados, tanto en sujetos con EPOC que nunca habían recibido tratamiento con corticoides inhalados, como en aquellos que sí están en tratamiento, no encontrando diferencias en los niveles de ambos grupos (36,118). Otros estudios demuestran que los niveles de LTB_4 aumentan en las exacerbaciones y que disminuyen al recibir tratamiento antibiótico (119) y no con el uso de corticoides, si bien no llegan a alcanzar los niveles obtenidos en el grupo control (118,120). Los niveles de LTB_4 también se encuentran levemente aumentados en los sujetos fumadores sanos comparados con personas sanas que nunca han fumado (121). Los cistenil leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 y LTE_4) juegan un papel importante en la fisiopatología de la obstrucción bronquial, ya que intervienen en la contracción de las fibras de músculo liso, aumentan la permeabilidad vascular, estimulan la secreción de moco y disminuyen el aclaramiento mucociliar (122). Los niveles del

LTE4 fueron similares tanto en los pacientes diagnosticados de EPOC como en los controles sanos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas. No obstante este marcador se encuentra aumentado en el condensado de los pacientes diagnosticados de asma, esta diferencia se explica porque los cisténil leucotrienos proceden fundamentalmente de las células plasmáticas y los eosinófilos que son más abundantes en este tipo de pacientes .

Las prostaglandinas proceden también del metabolismo del ácido araquidónico por la acción de la enzima ciclooxigenasa. Los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) están elevados en los pacientes con EPOC comparado con un grupo control sano fumador, no encontrándose diferencias significativas en los niveles medios entre el grupo de pacientes con EPOC que nunca había recibido tratamiento y los que sí estaban con corticoides inhalados (83). Al igual que pasaba con el LTB4, los niveles de la PGE2 aumentan en las agudizaciones para posteriormente disminuir con el tratamiento. Los niveles de PGE2 permanecen elevados en los pacientes con EPOC a pesar de haber dejado de fumar. Al igual que ocurría con el LTE4 los niveles de otras prostaglandinas analizadas, como es el caso de la PGD2 fueron similares tanto en los pacientes diagnosticados de EPOC como en los controles sanos, no encontrando diferencias significativas entre ambos grupos.

No se ha tenido éxito a la hora de detectar tromboxano B₂ (TxB₂), que es otro metabolito derivado del ácido araquidónico.

El 8-isoprostano (8-ISO) es un derivado del ácido araquidónico producido por la peroxidación del mismo por radicales libres de oxígeno. El 8-ISO ejerce una potente acción biológica que puede ser relevante en la fisiopatología de enfermedades pulmonares (19). Los niveles de 8-ISO están elevados en pacientes con EPOC estable, no encontrando diferencias significativas entre el grupo con antecedentes de tabaquismo activo y el que había dejado de fumar(83,92). Otros estudios demuestran que los niveles aumentan más en las reagudizaciones y disminuyen tras recibir tratamiento antibiótico aunque no llegan a igualarse al grupo control, persistiendo elevados a pesar de haber pasado dos meses de la reagudización (119).

Las interleucinas (IL) juegan un papel muy importante en la cadena inflamatoria. Nosotros nos hemos centrado en el estudio de la IL-8 por su especial relevancia en los pacientes con EPOC. La IL-8 es un mediador inflamatorio producido por los macrófagos y células del epitelio aéreo (123) con acción quimiotáctica y de activación sobre neutrófilos (124), que juegan un importante papel en la inflamación de las vías aéreas en la EPOC. La concentración de IL-8 en esputo se correlaciona con el grado de obstrucción de la vía aérea y podría ser

empleado como marcador del nivel de inflamación de la misma (127). Otra IL detectada es la IL-6 que presenta niveles elevados en los pacientes diagnosticados de EPOC, no obstante este marcador es muy poco específico, ya que también se encuentra elevado en los sujetos fumadores sanos, pacientes con síndrome de apnea del sueño y carcinoma broncogénico no microcítico (92).

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Este proyecto intenta demostrar la existencia de diferencias en el componente inflamatorio y en el estrés oxidativo a nivel local y sistémico en dos fenotipos de EPOC (enfisematoso-tipo A y bronquítico crónico-tipo B). La identificación de estos dos fenotipos fue realizada en base a los clásicos criterios clínicos y a características funcionales (estudios de difusión pulmonar) independientemente de que pueda haber pacientes con características mixtas. La confirmación de estos fenotipos permitiría explicar la heterogeneidad de la EPOC y podría abrir nuevas vías de trabajo que nos ayuden a entender mejor su patogenia, su historia natural y la respuesta a diferentes tratamientos.

7. UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO

La identificación de diferentes fenotipos de EPOC es un elemento fundamental para conocer mejor la patogenia y la historia natural de la enfermedad. Además, permitiría definir subgrupos de pacientes con EPOC que pueden beneficiarse de forma especial de diversas medidas terapéuticas (corticoides inhalados, etc.) e identificar dianas terapéuticas que pueden ser especialmente útiles en determinados tipos de pacientes con EPOC.

8. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Analizar si existen diferencias en la respuesta inflamatoria (sistémica y pulmonar) en dos fenotipos de EPOC con similar grado de obstrucción al flujo aéreo.

Analizar si existen diferencias en el grado de estrés oxidativo (sistémico y pulmonar) en dos fenotipos de EPOC con similar grado de obstrucción al flujo aéreo.

Estimar la asociación entre marcadores de la inflamación y del estrés oxidativo y las variables clínicas.

9. PACIENTES Y MÉTODOS

9.1 Población y características del estudio

Para la realización del estudio se seleccionó un grupo control formado por personas sanas fumadoras y otro grupo de pacientes diagnosticados de EPOC. El índice paquete-año en los tres grupos debía ser mayor de 20 p/a. Los pacientes fueron diagnosticados y clasificados de EPOC de acuerdo con la guía Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) (7). El grupo de controles estaba formado por 15 personas que fueron reclutadas en nuestro centro de trabajo en la consulta de deshabituación tabáquica. Los pacientes con EPOC fueron divididos en dos grupos utilizando la técnica de difusión pulmonar expresado los resultados como el cociente $\text{DLCO}/\text{VA}\%$. Fueron clasificados como EPOC con predominio de enfisema (EPOC-A; $n=15$) aquellos pacientes con una $\text{DLCO}/\text{VA}\%$ menor del 80% y EPOC con predominio de bronquitis crónica aquellos pacientes con una $\text{DLCO}/\text{VA}\%$ mayor del 80% (COPD-B; $n=24$). Las características clínicas y los hallazgos radiológicos fueron utilizados para confirmar ambos grupos. Los pacientes fueron diagnosticados en las consultas externas de la Sección de Neumología del Hospital Universitario de Guadalajara. Todos los grupos estaban formados por varones.

Se trata de un estudio de caso-control en el que se eligen a los sujetos que van a formar parte de la muestra a estudio por la presencia o ausencia de EPOC. Estas personas debían de cumplir todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión. Los criterios de inclusión y exclusión para la selección de los sujetos a estudio se detallan a continuación.

Criterios de inclusión para los casos:

- Fumadores o exfumadores con un índice paquete/año superior a 20 paquetes/año.
- Cumplir los criterios de la Normativa GOLD (7) para el diagnóstico de EPOC.

Criterios de inclusión para los controles:

- Fumadores activos con un índice paquete año superior a 20 paquetes/año.
- Pruebas funcionales respiratorias en las que se descarta la presencia de limitación al flujo aéreo.

Criterios de exclusión:

Se excluyó a todos aquellos pacientes que cumplían alguno de los siguientes criterios:

- Historia de asma.
- Lesiones pulmonares residuales o bronquiectasias evidentes en radiografía simple de tórax.
- Presencia de otra enfermedad sistémica inflamatoria aguda o crónica asociada.
- Agudización de la enfermedad de base durante el mes previo al estudio.
- Uso de broncodilatadores inhalados de larga duración 12 horas antes del estudio (excepto salbutamol o bromuro de ipratropio a demanda).
- Uso de corticoides sistémicos u otra medicación antiinflamatoria sistémica durante el mes previo al estudio.

9.2 Aspectos éticos del estudio

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital Universitario de Guadalajara. Todos los pacientes recibieron información oral y escrita en la que se explicaba el objetivo del estudio y los procedimientos a realizar. Para iniciar el estudio fue necesario su consentimiento informado por escrito.

9.3 Desarrollo del estudio

Tras ser informados los pacientes y firmar el consentimiento informado se iniciaron los procedimientos del estudio que se describen a continuación.

Se realizó una anamnesis completa con un cuestionario previamente diseñado y que se describe con detalle en la sección técnicas empleadas - variables clínicas. En este cuestionario se preguntaba acerca de la presencia de enfermedades concomitantes, uso de medicación habitual, existencia de síntomas respiratorios, consumo de tabaco, alcohol, factores ambientales y laborales, disnea medida con la escala Medical Research Council (161), peso, talla, índice de masa corporal ($IMC = \text{peso(kg)} / \text{talla(m)}^2$ se calculó con el peso y la talla medida el mismo día de la visita), e historia de atopia y una exploración física estándar. Todos aquellos pacientes en los que

durante la anamnesis se detectaron otras enfermedades concomitantes, tanto respiratorias como sistémicas, que pudieran interferir en los resultados del estudio fueron excluidos. Se recogió información sobre el consumo de tabaco, calculando el índice de número de paquetes/año (número de paquetes al día por el número de años fumando) y haciendo constar si la persona seguía fumando en la fecha en que el estudio fue realizado.

Una vez finalizada la entrevista se procedió a obtener el condensado de aire exhalado. Se utilizó un condensador ANACON comercializado por la compañía BIOSTEC. Previamente se había pedido a las personas que eran fumadoras que dejaran de fumar 4 horas antes de la obtención del condensado. Las muestras de condensado fueron procesadas inmediatamente dividiendo las muestras en alícuotas y congelándolas a -80°C para su ulterior análisis. El pH fue la única variable que se analizó inmediatamente después de la obtención del condensado (ver el apartado de Técnicas Empleadas).

Tras la obtención del condensado se realizó la extracción de sangre periférica. El estudio constaba de un sistemático de sangre, estudio de coagulación, recuento de iones, glucosa, perfil hepático, perfil renal, proteína C reactiva (PCR) de alta sensibilidad, fibrinógeno, anticuerpos antinucleares (ANA) e inmunoglobulina E (IgE) total. Se analizaron marcadores de la respuesta inflamatoria y del estrés

oxidativo, que incluían niveles de IL-8, 8-isoprostano y LTB4 (ver el apartado Técnicas Empleadas).

La valoración funcional, que fue la última técnica realizada, incluía una espirometría forzada, espirometría lenta, volúmenes pulmonares y difusión de CO (ver el apartado de Técnicas Empleadas).

9.4 Técnicas empleadas:

9.4.1 Variables clínicas

Las variables clínicas de los pacientes fueron anotadas en una hoja de recogida de datos. En esta hoja se anotaron los datos de filiación de los pacientes, antecedentes laborales, hábitos tóxicos, antecedentes personales y familiares neumológicos de interés descartando otras enfermedades asociadas. Se anotó la exploración física completa del paciente el mismo día en que se realizó la recogida del condensado. También se apuntaron los resultados de laboratorio, pruebas funcionales respiratorias y tratamiento habitual.

La hoja de recogida de datos que se utilizó en el estudio se detalla a continuación en las figuras 3 y 4.

SECCIÓN DE NEUMOLOGÍA	HOJA DE RECOGIDA DE DATOS
Hospital Universitario de Guadalajara	Fecha de Recogida de datos:
Nombre:	Médico:
Fecha Nacimiento:	Fecha:
Género: M / F	NHC: Consulta:
Fumador: sí / no / ex (IPA:)	Abuso de drogas inhaladas: sí / no / ex
Trabajo:	Exposición animales:
Exposición tóxicos inhalados: sí/no	Orgánicos / inorgánicos (tipo:)
Fármacos previos al diagnóstico (duración del tratamiento):	
<div></div>	
Antecedentes familiares neumológicos de interés:	
<div></div>	
Otras enfermedades asociadas:	
<div></div>	
Enfermedad y situación actual de la EPOC	
<div></div>	
EXPLORACIÓN FÍSICA	
<div></div>	

Figura 3. Hoja de recogida de datos – página 1.

9.4.2 Técnicas de imagen

Se realizó a todos los pacientes con EPOC una radiografía posteroanterior y lateral de tórax. Se pedía al paciente que permaneciese de pie e inspirase profundamente manteniendo el aire sin soltarlo. El foco se localizaba a dos metros del paciente. El tiempo de exposición fue de 0.05 segundos. Las radiografías de tórax fueron realizadas en las 72 horas previas a la recogida del condensado. Se calcularon las puntuaciones de bronquitis crónica y enfisema, puntuando de 0 a 16 como se describe en el artículo de Miniati. (129). Las puntuaciones de bronquitis crónica y enfisema han demostrado ser reproducibles entre distintos observadores. Según este trabajo para la evaluación clínica del enfisema, la información obtenida de una lectura normal de una radiografía de tórax es comparable a la obtenida mediante un análisis cualitativo y cuantitativo de una tomografía computarizada de alta resolución.

Para el análisis de las radiografías de tórax se utilizó una tabla en la que se incluían los signos de hiperinsuflación y anomalías vasculares pulmonares conocidas que se asocian a enfisema (tabla 2). Signos de hiperinsuflación, como por ejemplo, depresión y aplanamiento de los hemidiafragmas, evaluados tanto en visión posteroanterior y lateral de tórax y un incremento del espacio retroesternal fueron puntuados de 0 a 3. Para la puntuación de las

anormalidades vasculares la proyección posteroanterior fue dividida en 4 cuadrantes tomando como referencia la carina. Cada cuadrante fue analizado estudiando la presencia de alguna de las anormalidades vasculares que se detallan en la tabla 2 a las que se les asignó una puntuación de 0.5. Las puntuaciones parciales de los cuatro cuadrantes fueron sumadas y combinadas con la puntuación de hiperinsuflación para completar la puntuación total de enfisema que iba de 0 a 16.

Hallazgos en la radiografía de tórax	Puntuación
Espacio retroesternal aumentado	0 a 3
Aplanamiento de los diafragmas	0 a 3
Aumento de la angulación de las ramas vasculares	0 a 0.5*
Pérdida de la sinuosidad normal de los vasos con pérdida de las ramas	0 a 0.5*
Aumento delafilamiento de los vasos con reducción del calibre	0 a 0.5*
Aumento de la zona clara periférica normal del pulmón	0 a 0.5*
Pérdida del patrón de fondo normal e incremento de la claridad pulmonar	0 a 0.5*

Tabla 2. Criterios para evaluar el enfisema en la radiografía de tórax.

*Evaluado para cada uno de los cuatro cuadrantes en la proyección posteroanterior dividiendo la radiografía desde la carina (129).

9.4.3 Estudio funcional respiratorio

El estudio funcional se realizó después de haber realizado la técnica de recogida del condensado de aire exhalado, ya que se ha demostrado que esta técnica no interfiere en los resultados de las pruebas funcionales respiratorias (92).

Para el estudio funcional se utilizó un espirómetro, pletismógrafo y analizador de gases MASTER LAB (Erich Jaeger, Wurzburg, Germany). La medición del $DLCO_c/VA$ se realizó con el método de respiración única. Las pruebas funcionales respiratorias fueron realizadas de acuerdo a las recomendaciones de la Sociedad Europea de Respiratorio. Los valores predichos utilizados para las variables de función pulmonar se han obtenido de la European Community for Coal and Steel. Corregimos el factor de transferencia para la hemoglobina de acuerdo con el método de Cotes (128). A continuación se describen los datos técnicos del equipo utilizado y se exponen unos gráficos de las técnicas realizadas. En la tabla 3 vienen recogidas las características del dispositivo Master Lab.

Medición de flujos	JAEGER Pneumotach
Rango	0 - ± 20 l/s
Exactitud	0.2 - 12 l/s ± 2 %
Resistencia	< 0.05 kPa/(l/s) a 10 l/s
Determinación del volumen	Integración digital
Rango	0 - ± 20 l/s
Exactitud	5 ml
Presión Bucal	JAEGER transductor de presión
Rango	± 20 kPa
Exactitud	$< \pm 2$ %
Presión en cabina	JAEGER transductor de presión
Rango	± 1 kPa
Exactitud	$< \pm 2$ %
Cabina	Aluminio/cristal acrílico
Principal	volumen-constante
Volumen	830 l
Simulación BTPS	ASC electronics
Calibración	CAL-Pack, automatico

Tabla 3. Datos técnicos del dispositivo Master Lab



Figura 5. Imagen del dispositivo Master Lab empleado para el estudio.

9.4.4 Obtención del condensado de aire exhalado

La obtención del condensado de aire exhalado se obtuvo con un condensador ANACON (BIOSTEC) el mismo día que se realizaron las pruebas funcionales respiratorias y la extracción de la muestra de sangre. La prueba se realizó en una habitación en condiciones estables de temperatura y humedad. El equipo estaba conectado de tal manera que evitara la contaminación salival, con válvulas unidireccionales para prevenir la reinhalación a través del condensador y también para evitar la condensación del aire ambiente. Durante el estudio se utilizó el mismo condensador. El equipo está formado por material inerte en la superficie del condensador, aunque diferentes materiales pudieran tener diferentes reacciones con el material que recubre las tubuladuras.

9.4.5 Descripción del condensador de aire exhalado

Anacon es un equipo generador de bajas temperaturas, diseñado para la condensación o congelación del contenido acuoso del aire exhalado. Su rendimiento es elevado: en condiciones idóneas (20-24 °C de temperatura ambiente, menos del 65% de humedad) genera un gradiente térmico superior a 35°C.

Este condensador puede ser utilizado tanto en pacientes que respiran espontáneamente como en pacientes ventilados mecánicamente,

sin más dificultad que intercalar el condensador en el circuito espiratorio del paciente.

Es un equipo portátil, diseñado para su uso en ámbitos clínicos y hospitalarios. Se sustenta sobre un soporte vertical con ruedas, con una mínima ocupación de espacio. Ello permite su fácil desplazamiento desde las áreas de dispensario o laboratorio a las habitaciones de los pacientes o a la Unidad de Cuidados Intensivos. Genera frío en el propio lugar de utilización. En condiciones usuales (20-26 °C de temperatura ambiente) alcanza temperaturas de condensación en menos de cinco minutos. Utiliza energía eléctrica y está exento de gases o líquidos de refrigeración, que pudieran contaminar el ambiente.

Esquema del circuito de respiración del condensador de exhalado ANACON, para pacientes en respiración espontánea

El dispositivo refrigerador de ANACON es un bloque de duraluminio, en el que se introducen los tubos de cristal termo-resistente de condensación. Estos tubos forman parte del circuito espiratorio del paciente. Tres válvulas unidireccionales y una pieza en T, protegen al paciente de la reinhalación y aseguran la unidireccionalidad del aire respirado.

- Base con ruedas (Diámetro aproximado: 67cm)
- Mástil telescópico
- Dispositivo enfriador con Termómetro incorporado (Temperatura ambiente- Temperatura de condensación). Salto térmico garantizado mayor de 30°C
- Fuente de alimentación. Tensión monofásica : 220V. Tensión en el circuito de corriente continua :12 V. Amperios (máxima) circuito de continua :16 A.
- Accesorios para el circuito de respiración y recogida de muestras.
- Dimensiones del Equipo montado en su soporte: Altura mínima aproximado:120 cm. Altura máxima :160 cm. Peso : 15 Kg.

Tabla 4. Datos técnicos del condensador ANACON

Recogida del condensado en respiración espontánea sin oxigenoterapia

Para la recogida del condensado en pacientes que no necesitan tratamiento con oxigenoterapia se realiza el montaje del circuito de respiración como se indica en la figura 6. Se pone en marcha el interruptor general del aparato (situado en la caja de la fuente de alimentación) y a continuación el interruptor de enfriamiento. Se pide al paciente que se enjuague la boca varias veces con agua destilada y se le instruye para que no tosa o eructe mientras dure la prueba. Esperamos a que la temperatura del condensador

descienda al menos por debajo de 0°C , entonces procedemos a conectar al paciente a la boquilla, con los labios cerrados en torno a ella. Colocamos, justo antes conectar al paciente a la boquilla, una pinza nasal para evitar la inhalación o exhalación por la nariz. A temperaturas de colección inferiores a -8°C el vapor exhalado es congelado en los tubos de condensación, por lo que no aparece en el tubo colector hasta su descongelación. Dependiendo de la cantidad que se desee recoger y de la ventilación del paciente, el tiempo de colección puede ser más o menos largo.

Como indicador aproximado se puede utilizar la siguiente tabla (tabla 5) que se encuentra en el manual de instrucciones del condensador.

El tiempo de colección no debe ser en ningún caso inferior a 10 minutos. Nosotros decidimos que la prueba durase 15 minutos para así obtener una mayor cantidad de condensado pues queríamos analizar varias moléculas inflamatorias. Durante el periodo de colección el paciente puede desconectarse para tragar la saliva (no es conveniente que se acumule saliva en la boca), y se le estimulará para que realice inspiraciones profundas de vez en cuando, si no hay contraindicación para ello. Una vez concluido el periodo de colección se desconectará el interruptor de enfriamiento, dejando que los ventiladores actúen durante al menos un minuto antes de desconectar el interruptor general.

Complexión	Recogida media	Tiempo para 2-3ml
Grande (>80kg)	125 L/min	20 min
Mediana (60-80kg)	100 L/min	25 min
Pequeña (<60kg)	60 L/min	35 min

Tabla 5. Tiempo estimado de para la obtención de 2-3 ml de condensado.

Recogida del condensado en pacientes en respiración espontánea con oxigenoterapia

Con este condensador también se pueden obtener muestras de condensado en aquellos pacientes que requieren tratamiento con oxigenoterapia. El circuito de respiración ha de montarse añadiendo un sistema Venturi de administración de oxígeno, preferentemente regulable, tal y como se indica en la figura 8 excepto el número 14 que es un sistema Venturi regulable. Es necesario asegurar que el flujo de O₂ corresponda a la concentración que se desea obtener. Si el paciente lleva oxigenoterapia con gafas nasales, se debe retirar éstas, colocar una pinza nasal, e instalar el accesorio para oxigenoterapia tal y como indica la figura 8.

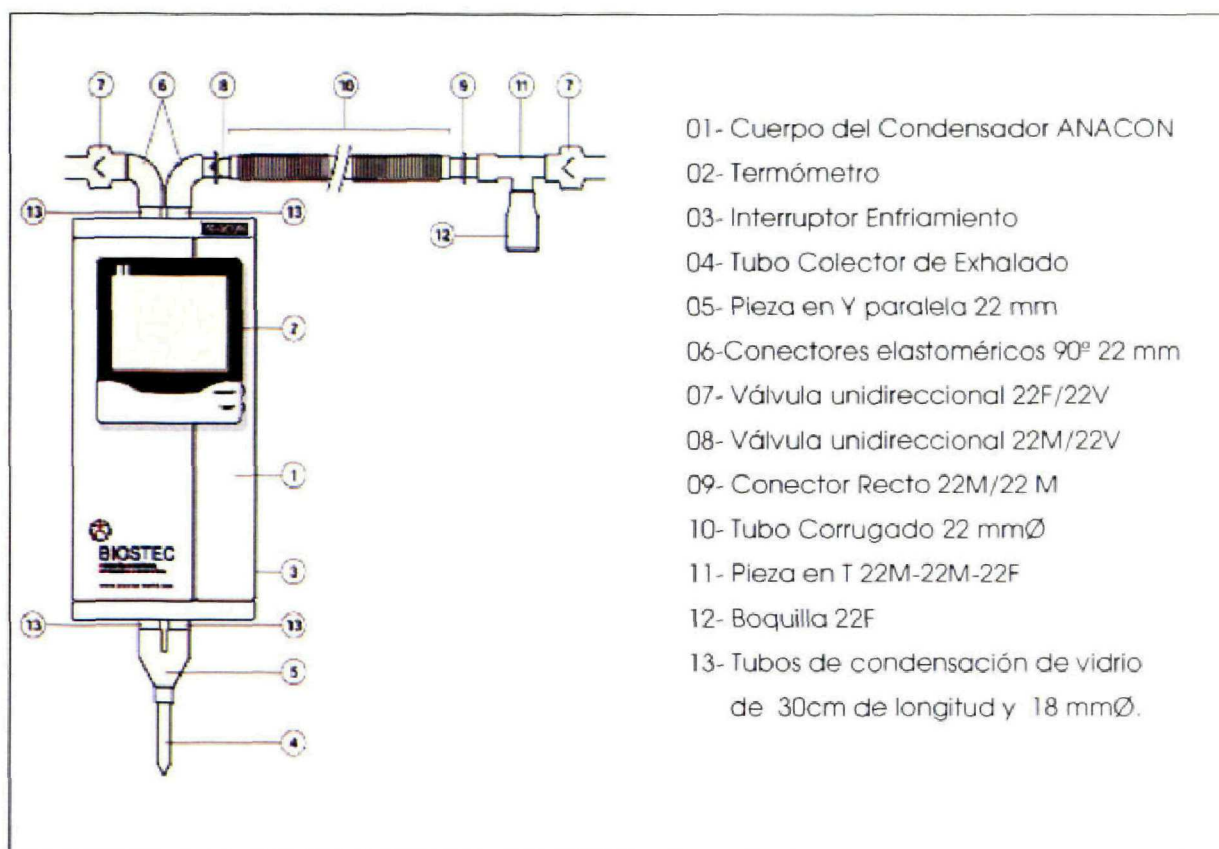


Figura 6. Estructura del Condensador ANACON

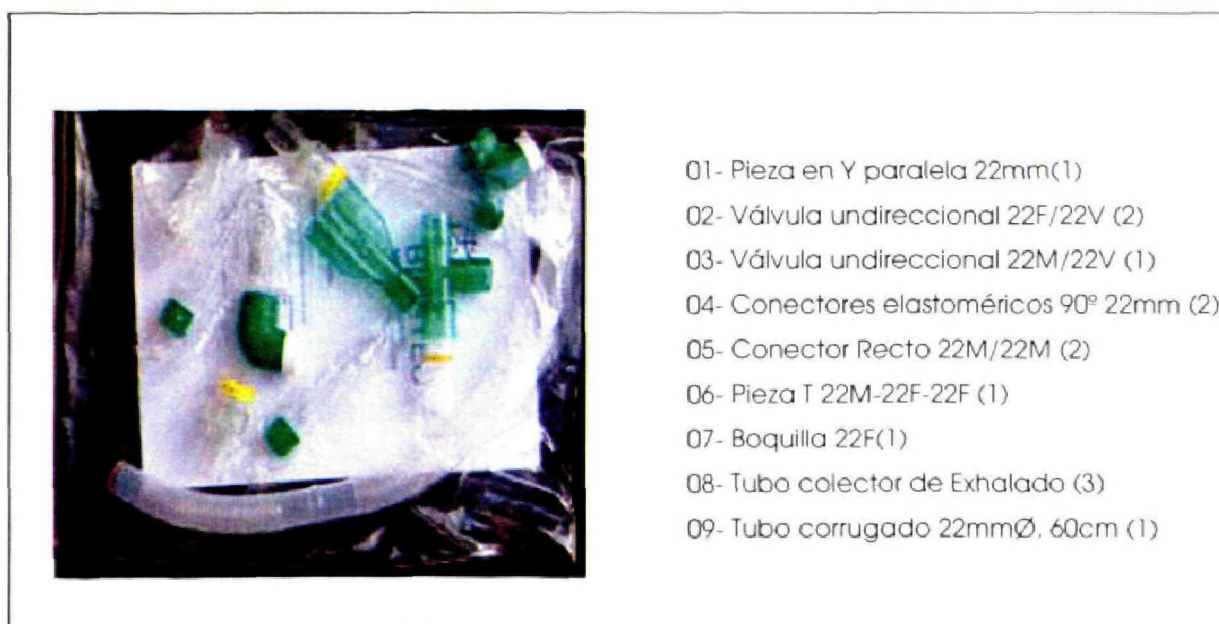


Figura 7. Contenido de una bolsa con Circuito de Respiración

Realizar la colección de exhalado como se ha descrito en el caso de pacientes sin oxigenoterapia. Al terminar la colección del condensado debemos restaurar la oxigenoterapia con el sistema que llevaba el paciente. En nuestro caso no fue necesario aplicar este dispositivo ya que ninguno de nuestros pacientes necesitaba este tipo de terapia.

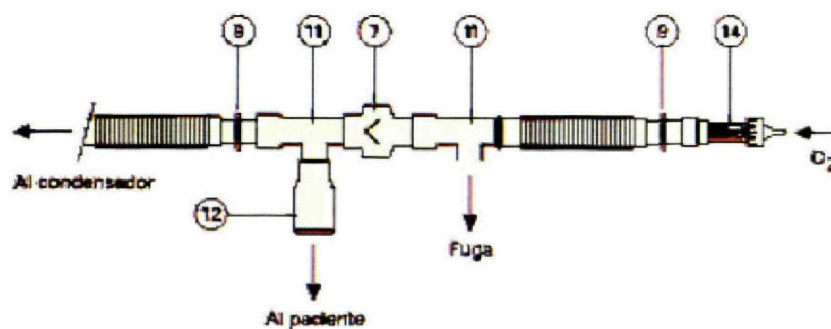


Figura 8. Descripción del circuito de respiración en pacientes con oxígeno.

Colección del condensado en pacientes ventilados mecánicamente

En los pacientes que requieren ventilación mecánica invasiva también es factible obtener una muestra de condensado. Para ello es necesario retirar el filtro de la conexión al tubo traqueal, intercalar el

condensador Anacon en el tubo espiratorio a unos 40-60 cm de la pieza en T y sustituir el segmento de tubo corrugado proximal al paciente por uno nuevo (figura 9). El tubo corrugado se conecta al codo del circuito del condensador, mediante un conector M/M 22 mm. El otro codo del circuito del condensador se conecta a la rama libre del tubo espiratorio del respirador mediante otra pieza M/M 22 mm. Es necesario comprobar los parámetros de ventilación y poner en marcha el interruptor general del aparato y a continuación el interruptor de enfriamiento. Durante la ventilación mecánica el tiempo de recogida (y por tanto la cantidad recolectada) puede ser mucho mayor que en respiración espontánea. Es importante tener la precaución de vigilar la presión positiva final espiratoria (PEEP) durante recogidas prolongadas, especialmente cuando el exhalado se obtiene por congelación (temperatura menor de -8° C), por la reducción del diámetro del circuito espiratorio. Al acabar la recogida de exhalado debemos recomponer el circuito del ventilador como previamente.

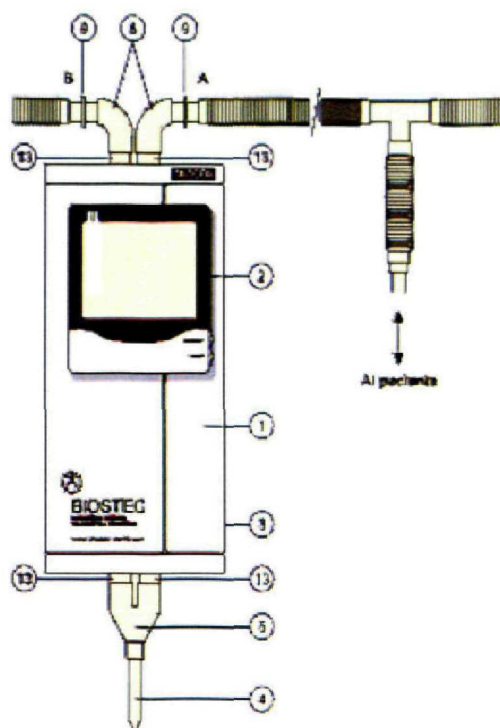


Figura 9. Descripción del sistema de respiración en pacientes con ventilación mecánica.

Recuperación del Condensado

Al concluir el periodo de colección el condensado exhalado puede hallarse en forma líquida (condensado propiamente dicho) o congelado en el interior de los tubos de condensación de vidrio. En cualquiera de los dos casos la forma más operativa de recuperar el condensado es la siguiente:

- 1- Sujetar la pieza en Y, desencajar los codos de goma de

los tubos de condensación y extraer el conjunto por la parte inferior del condensador. Cubrir la parte libre de los tubos y dejar el conjunto (tubos + pieza en Y + tubo colector) en una gradilla o soporte de forma que quede vertical.

- 2- Cuando el contenido de los tubos se haya descongelado totalmente, agitar el conjunto golpeando ligeramente sobre una superficie blanda para hacer descender el líquido adherido a las paredes de los tubos de condensación hasta el tubo colector.

Extracción de los tubos de condensación de vidrio.

Tras la recogida de exhalado, se cierra el interruptor de enfriamiento y se espera que la temperatura del condensador sea de unos $+5^{\circ}\text{C}$, entonces se procede a extraer el conjunto de tubos de condensación. Para extraer los tubos de vidrio se desconectan los codos de goma, mientras se sujeta el conjunto por la pieza en Y, una vez desconectados se extrae el conjunto de condensación formado por los tubos, la pieza en Y y el tubo colector, dejándolos salir suavemente por la parte inferior. Los tubos de vidrio se reemplazan de una recogida a otra, pero son de muy fácil limpieza y desinfección, y pueden ser esterilizados.

Limpieza y mantenimiento

La protección de paciente frente a la reinhalación desde el circuito de condensación hace que no sea estrictamente necesario sustituir todas las piezas más allá de la primera válvula espiratoria. Las piezas del circuito se sumergen en una solución desinfectante y se enjuagarán con abundante agua destilada, secándose antes de su nueva utilización.

En el caso de que, por razones de patología (por ejemplo infecciones pulmonares especialmente agresivas) se desee un mayor grado de protección, se esterilizarán los tubos colectores de vidrio y se desechará la totalidad del circuito respiratorio (figura 10).

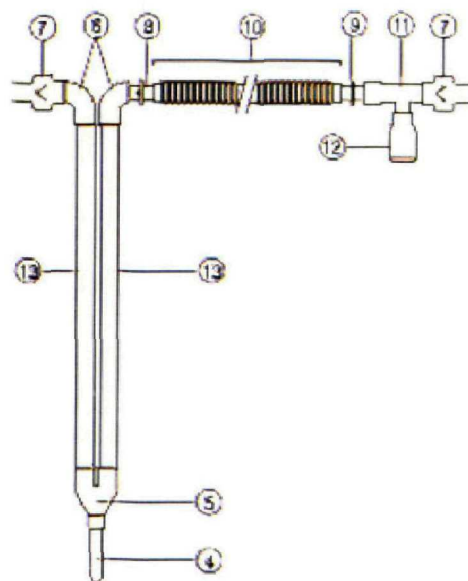


Figura 10. Imagen de los tubos de condensación de vidrio y las tubuladuras.

9.4.6 Procesado de las muestras de condensado

Debido a que la mayoría de las moléculas no pueden ser analizadas en el momento de la recogida, a excepción del pH, las muestras fueron distribuidas en alícuotas de 200 μ L una vez recuperada toda la muestra del condensador. Inmediatamente después fueron almacenadas en un congelador a -80° C para su posterior análisis. El pH fue la única variable que se midió inmediatamente después de la recuperación del condensado. La muestra fue dividida para evitar múltiples ciclos de congelado y descongelado que podrían alterar o destruir algunos mediadores, tales como las prostaglandinas, isoprostanos y leucotrienos. El análisis fue realizado en un intervalo de tiempo que no sobrepasaba los dos meses desde la recogida de las muestras.

9.4.7 Análisis del pH en las muestras de condensado

Las mediciones del pH fueron realizadas inmediatamente después de la obtención del condensado. Si bien en otros estudios recomiendan la aireación de la muestra con un gas que no contenga CO para aumentar la estabilidad de los resultados del pH analizado (101) nosotros no procedimos a realizar dicha técnica para evitar la pérdida de marcadores inflamatorios de la muestra. Ambas muestras fueron analizadas con un pH-metro (pH-Meter CG 840 Gerate GMBH,

Germany). En la tabla 6 y 7 se describen las características técnicas del equipo.

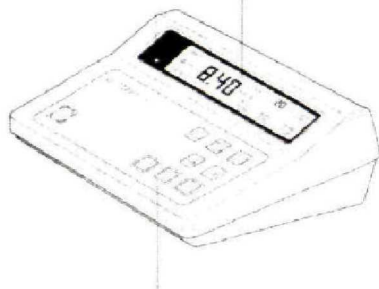


Tabla 6. pH-Metro CG 840 Gerate GMBH, Alemania. Descripción técnica del equipo utilizado para la medición del pH en las muestras de condensado.

Numerical display:	3½digit LCD display for pH, mV, H = 18 mm 2½digit LCD display for temperature; H = 7 mm
Segment displays:	pH, mV, WAIT, Δ, RESET, °C auto, %, °C man, CAL, buffer sets
Pilot light CG 840:	green LED
Battery low indicator CG 840 B:	red LED
Measuring ranges (1 digit =) :	pH: 0.00... 14.00 (pH = 0.01) U: - 1000 ... + 1700 mV (1 mV) T: - 199 ... + 199 °C (0.1 K)
Tolerance:	ΔpH ≤ 0.01 ± 1 digit ΔU ≤ 1 mV ± 1 digit ΔT ≤ 0.2 K (- 150... + 150 °C) ± 1 digit (plus the tolerance of the Pt 1000)
Input resistance (20 °C):	≥ 10 ¹² Ω
Offset current (20 °C):	≤ 10 ⁻¹² A
Temperature compensation:	manual: - 1 ... + 100 °C automatic: - 199 ... + 199 °C (with Pt 1000)
Slope matching:	85... 105 %
Zero point matching:	pH = 5.5 ... 8
Calibration, automatic:	with 2 buffer sets (switch selected) 1: pH = 4.00/7.00/10.00 2: pH = 4.01/6.87/ 9.18 (DIN 19 266 + NBS)
Electrode connector:	Socket according to DIN 19 262, 2 and 4 mm sockets for reference electrode
Connector for resistance thermometer (Pt 1000):	2 and 4 mm sockets
Chart recorder output:	4 mm sockets R _i = 2 kΩ pH: 118 mV/Δ pH at 25 °C and 100 % slope U: 1 mV/mV for servo chart recorders with floating input
Power supply CG 840:	Mains connection: 90...250 V~, 50...60 Hz, 2.5 VA, protection class II Connection: Small instruments plug, according to DIN 49 455 (built-in small instruments plug, pin distance 8.6 mm)
Power supply CG 840 B:	Batteries: 4 Mignon cells IEC-LR6, external access for replacement, or mains power supply via transformer in mains plug (7 to 15 V~) Connection: Low voltage built in plug, pluspol on the pin contact (internal contact = ø 2.1 mm) USA/Japan
Ambient temperature:	0 ... 50 °C
Case:	ABS table cabinet, shielded, sprayproof
Dimensions:	240 x 80 x 180 mm (W x H x D)
Weight:	approx. 0.8 kg


<p>Electrodos de pH con sensor de temperatura</p> <p>Sistema de referencia: plata/ plata clorhídrica</p> <p>Material del pozo: cristal</p> <p>Punto cero: $\text{pH} = 7.0 \pm 0.3$</p> <p>Electrolito: $\text{KCl } 3 \text{ mol/l}$</p> <p>Sensor de temperatura: Pt 1000</p> <p>Forma de la membrana: esférica</p> <p>pH rango: 0 . . . 14</p> <p>Cable de conexión: para SMEK-plug head: e.g. LS 1 ANN</p> <p>Cable fijo: 1 m longitud, con plug A acc. a DIN 19262 o con enchufe BNC, así como enchufe para el sensor de temperatura.</p>	
<p>Electrodo N-2041-A Gerate GMBH, Alemania.</p> <p>Electrodo utilizado con el pH metro.</p>	

Tabla 7. Descripción de las características técnicas del electrodo utilizado en el estudio.

9.4.8 Análisis de los marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo.

Medida de IL-8.

Se llevó a cabo mediante un kit de ELISA (BD Biosciences, San Diego, California, USA) con un límite de detección de 0,8 pg/ml según BD Biosciences y sin reactividad cruzada identificada. Las muestras de suero y de CAE no liofilizado se analizaron sin diluir. En el ensayo se emplearon 100µl de muestra, que fueron añadidos a un pocillo recubierto de anticuerpos monoclonales anti-IL8. Tras la unión IL-8-anticuerpo y el lavado de los pocillos se añadió otro anticuerpo anti-IL-8 conjugado con biotina, completando la unión tipo sandwich. La adición posterior de un complejo avidina-peroxidasa afin por la biotina y el revelado con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), sustrato de la peroxidasa, permiten la cuantificación de IL-8 en las muestras, cuya absorbancia se midió en un fotómetro a 450nm.

La cuantificación se realizó extrapolando los valores de absorbancia de las muestras en una curva obtenida a partir de diluciones de IL-8 de concentración conocida (entre 0 y 200 pg/ml) cuya absorbancia se mide paralelamente a las muestras (figura 11).

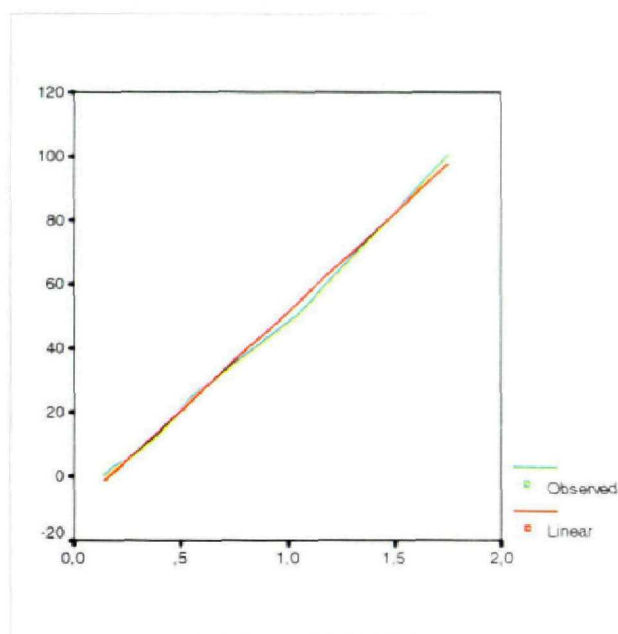


Figura 11. Curva de calibración de IL-8 (considerando 7 puntos).
Variable dependiente: Concentración IL-8. Variable independiente:
Absorbancia a 450nm. Concentración IL-8= $-10,342 + 61,4401 \cdot$
Absorbancia. $Rsq = 0,996$

Medida de LTB4.

La cuantificación de leucotrieno B4 se realizó mediante un kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) de inmunoensayo enzimático (EIA) con un límite de detección de 13 pg/ml según el fabricante y reactividad cruzada con moléculas de la familia de los leucotrienos menor de 0,01%. Las muestras de suero y de condensado no liofilizado se analizaron sin diluir. 50µl de muestra se

añadieron a un pocillo recubierto de IgG monoclonal de ratón por anticuerpos monoclonales anti-LTB₄ de conejo. Además de la muestra se añadió a los pocillos un trazador de concentración conocida (LTB₄ conjugado al enzima acetilcolinesterasa) y un antisuero con anticuerpos monoclonales anti-LTB₄. Ambos LTB₄ (conjugado y libre procedente de la muestra) se unen al antisuero y compiten para unirse con los anticuerpos del pocillo (figura 12). La medida final de absorbancia será debida al LTB₄ unido a acetilcolinesterasa, obteniéndose una medida indirecta de la concentración de leucotrieno B₄ en las muestras, que será tanto más elevada cuanto menos LTB₄-acetilcolinesterasa se haya unido a los anticuerpos de la placa.

Para revelar la presencia del LTB₄ conjugado a acetilcolinesterasa se añade, tras una noche de incubación y sucesivos lavados para eliminar los reactivos sobrantes, el reactivo de Ellman (acetilcolina más ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico), sustrato del enzima, obteniéndose un producto cuyo pico de absorbancia se sitúa a 412nm (la medida se realizó a 405nm).

Los cálculos a realizar para obtener la concentración de LTB₄ en las muestras se realizaron sobre una plantilla de Cayman Chemical que emplea como absorbancias del ensayo las resultantes de restar las absorbancias correspondientes al blanco y a las uniones no

específicas (NSB, correspondientes a un pocillo con buffer y trazador).

Este valor corregido de las absorbancias (B), dividido por B_0 , (máxima cantidad de trazador que es capaz de unir el antisuero). $\%B/B_0$ representa la absorbancia de cada pocillo en relación a la máxima unión trazador-antisuero.

Con los valores de $\%B/B_0$ de diluciones que tienen concentración conocida (entre 3.9 y 500 pg/ml) de LTB4 se realizó una curva estándar sobre la que se extrapolaron los valores de $\%B/B_0$ de las muestras, obteniéndose así las concentraciones de LTB4 en las mismas. (Figura 13)

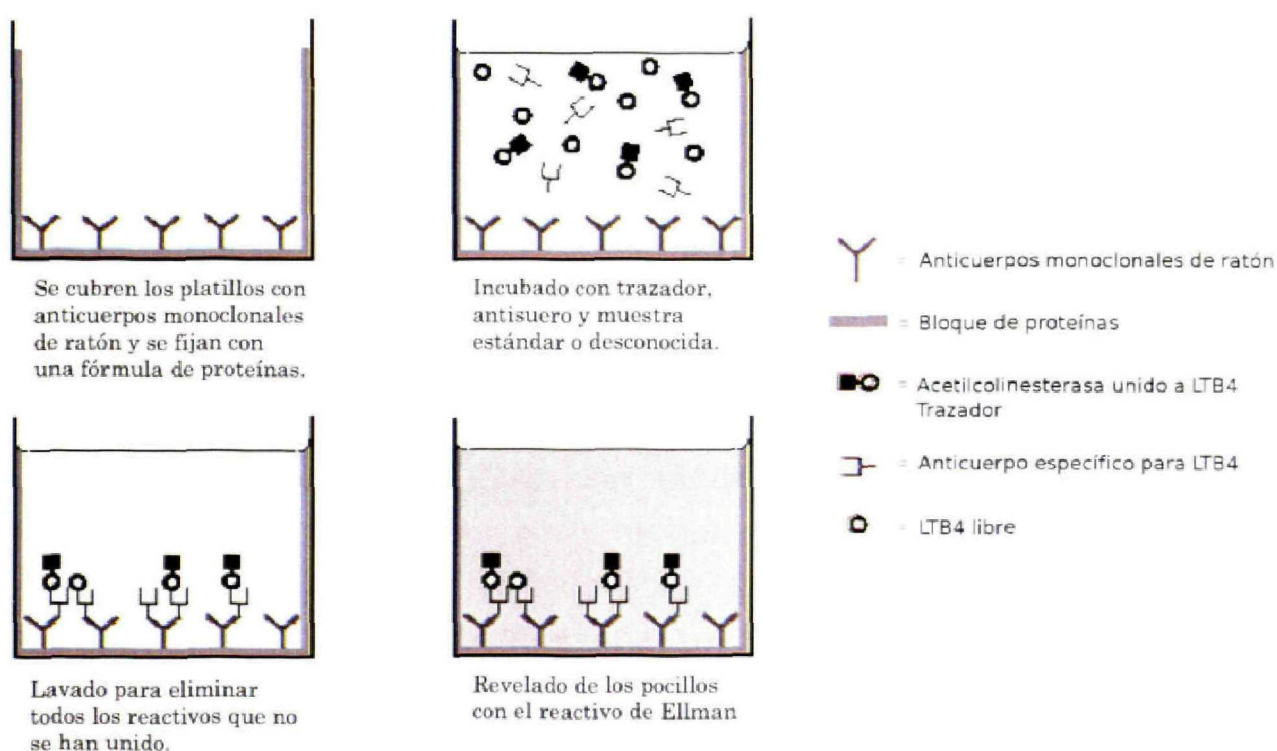


Figura 12. Esquematización de la técnica de medida de LTB4.

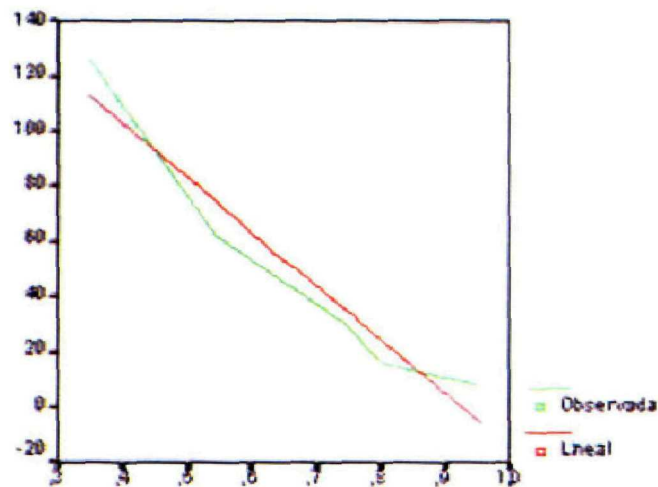


Figura 13. Curva de calibración del LTB4. Variable Independiente: B/B0. Variable Dependiente: Concentración de LTB4. Concentración de LTB4 = $180,141 - 194 \cdot B/B0$. $Rsq = 0,937$

Medida de 8-Isoprostano.

La cuantificación de 8-isoprostano (8-ISO) libre se realizó mediante un kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) de inmunoensayo enzimático (EIA) con un límite de detección, en nuestro estudio, de 5 pg/ml según el fabricante. Las muestras de suero y de CAE no liofilizado se analizaron sin diluir.

Se añadieron 50µl de muestra a un pocillo recubierto de IgG

monoclonal de ratón afin por anticuerpos monoclonales anti-8-ISO de conejo. Además de la muestra se añadió a los pocillos un trazador de concentración conocida (8-ISO conjugado al enzima acetilcolinesterasa) y un antisuero con anticuerpos monoclonales anti-8-ISO. Ambos 8-ISO (conjugado y libre procedente de la muestra) se unen al antisuero y compiten para unirse con los anticuerpos del pocillo (ver esquema). La medida final de absorbancia será debida al 8-ISO unido a acetilcolinesterasa, obteniéndose una medida indirecta de la concentración de leucotrieno B4 en las muestras, que será tanto más elevada cuanto menos 8-ISO-acetilcolinesterasa se haya unido a los anticuerpos de la placa (figura 14).

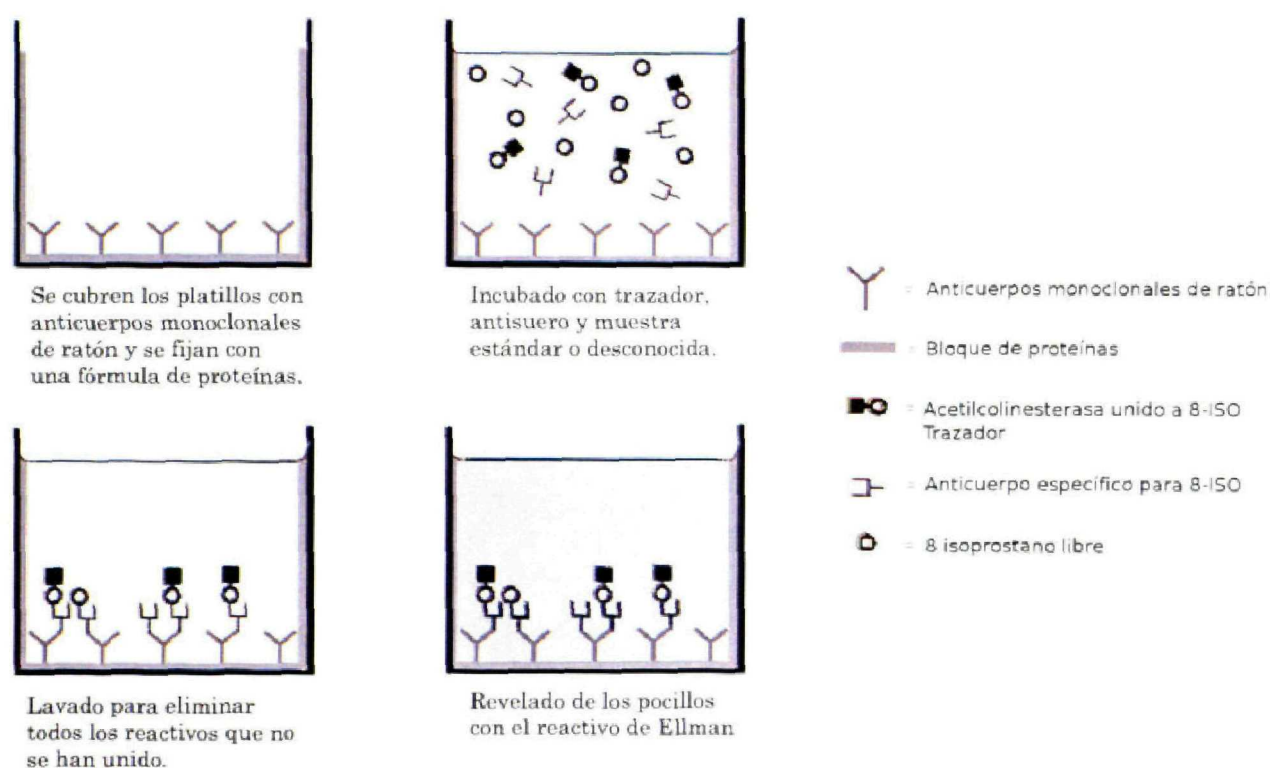


Figura 14. Esquematización de la técnica de medida del 8-ISO.

Para revelar la presencia del 8-ISO conjugado a acetilcolinesterasa se añade, tras una noche de incubación y sucesivos lavados para eliminar los reactivos sobrantes, el reactivo de Ellman (acetilcolina más ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico), sustrato del enzima, obteniéndose un producto cuyo pico de absorbancia se sitúa a 412nm (la medida se realizó a 405nm).

En este caso la curva obtenida al relacionar diluciones de concentración conocida de 8-isoprostano con sus %B/Bo fue la siguiente (figura 15):

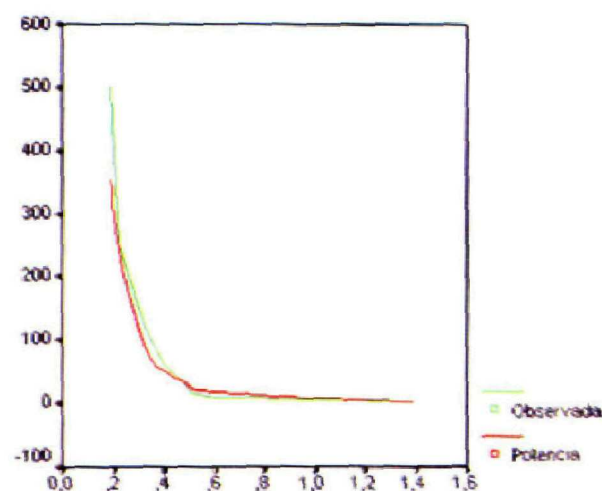


Figura 15. Curva de calibración del 8-isoprostano. Variable independiente: B/B0. Variable dependiente: concentración de 8-isoprostano. Concentración de 8-isoprostano = 4.8173. B/B0exp (-2,6108). Rsq = 0.771.

9.5 Tamaño de la muestra

Todo estudio lleva implícita en la fase de diseño la determinación del tamaño muestral necesario para su ejecución. Existen fórmulas sencillas que permiten calcular el tamaño muestral necesario para la estimación de diversos parámetros. Sin embargo, hemos decidido en base a las series revisadas en los trabajos publicados similares al nuestro utilizar un número muy similar de pacientes para formar los grupos que conforman la muestra. Es posible, en base a estos estudios publicados, asumir que el tamaño de la muestra seleccionado es adecuado para los objetivos del estudio.

9.6 Análisis estadístico:

La primera parte del estudio estadístico comprende un análisis descriptivo y estratificado de todas las variables. En el caso de que la variable a estudio siga una distribución Gaussiana y cumpla criterios de homocedasticidad el análisis estadístico se llevará a cabo mediante pruebas paramétricas presentando los variables cuantitativas como la media y la desviación estándar y las cualitativas en forma de porcentaje. En el caso de no ser así se utilizarán pruebas no paramétricas expresando las medidas de tendencia central con la mediana y el rango intercuartil.

Para estudiar las diferencias entre grupos de pacientes se empleará la *t* de Student o la prueba ANOVA de 1 factor y posteriormente el test de Bonferroni o la T2 de Tamhane (adecuada en grupos con varianzas distintas), en el caso que la variable a estudio siga una distribución normal. En aquellas variables que sigan una distribución asimétrica con varianzas heterogéneas o desiguales se utilizará la U de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn post hoc para comparaciones múltiples para detectar diferencias entre los distintos grupos. Para medir la relación entre las variables se utilizará el coeficiente de correlación de Spearman o Pearson para variables cuantitativas.

Un valor de $p < 0,05$ será considerado como estadísticamente significativo. El análisis de los datos se realizará mediante el paquete estadístico SPSS 11.0 y G-Stat 2.0 para Windows.

10. RESULTADOS

Características clínicas y funcionales

Las características demográficas de los pacientes se describen en la tabla 8. El índice de masa corporal fue menor en los pacientes con EPOC tipo A comparado con el resto de los grupos, si bien estas diferencias no alcanzaron significación estadística. El grado de limitación al flujo aéreo valorado por el FEV1 era similar en los dos grupos diagnosticados de EPOC, no existiendo diferencias significativas entre ambos. La capacidad de difusión pulmonar corregida para el volumen alveolar estaba reducida en el grupo de EPOC con predominio de enfisema comparado con el grupo con predominio de bronquitis crónica y el control ($p < 0.01$). La puntuación en la escala de disnea (MRC) era mayor en el grupo de pacientes EPOC-A comparada con el grupo EPOC-B ($p < 0.05$) y el control ($p < 0.01$).

Fórmula leucocitaria en sangre

No se encontraron diferencias en el recuento total de leucocitos entre los tres grupos (EPOC-A $7.3 \pm 1.4 \times 10^3$ /mL; EPOC-B $8.1 \pm 2.0 \times 10^3$ /mL; controles $7.5 \pm 2.2 \times 10^3$ /mL; $p > 0.05$). Figura 16.

	Controles	EPOC-B	EPOC-A	
Edad (años)	56 ± 6	67 ± 8	68 ± 9	
IMC (Kg/m ²)	26 ± 3	27 ± 4	24 ± 4	
Paquetes/año	> 30	> 30	> 30	
Fumadores activos	15/15	10/24	4/15	
Disnea (escala MRC)	0.06±0.25	1.42±0.72	2.06±0.59	#
FEV1(L)	3.9±0.7	1.48±0.4	1.37±0.52	
FEV1 (%)	107±18	54±12	55±16	
FVC(L)	4.62±0.7	2.95±0.7	3.0±0.6	
FVC (%)	104±13	83±14	92±17	&
TLC (%)	99±14	103±4	113±18	
RV (%)	107±39	141±50	162±42	
TLCO (%)	102±24	94±22	55±10	##
TLCO/VA (%)	113±18	115±25	61±10	##

Tabla 8. Características clínicas y funcionales de los sujetos que forman la muestra. IMC: índice de masa corporal. & p< 0.05 Entre ambos grupos de EPOC. # p< 0.01 Entre ambos grupos de EPOC ## p<0.000 Entre ambos grupos de EPOC

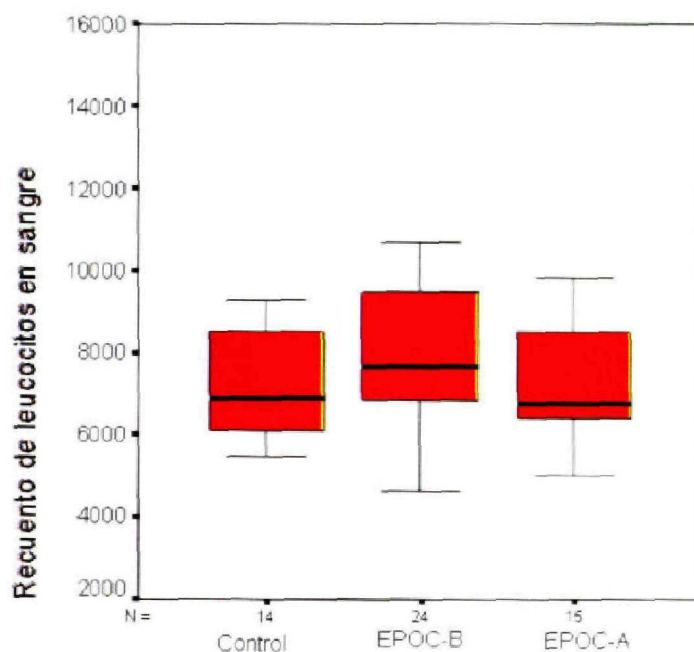


Figura 16. Recuento de leucocitos en sangre (/mL).

El recuento de neutrófilos fue significativamente mayor en los pacientes con EPOC que en el grupo control (EPOC-A $4.6 \pm 1.1 \times 10^3$ /mL; EPOC-B $5.1 \pm 1.7 \times 10^3$ /mL; controles $4.1 \pm 1.5 \times 10^3$ /mL; $p < 0.05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los dos fenotipos de EPOC ($p > 0.05$). Figura 17.

El número de linfocitos estaba reducido en el grupo EPOC comparado con el control (EPOC-A $1.9 \pm 0.5 \times 10^3$ /mL; EPOC-B $2.1 \pm 0.6 \times 10^3$ /mL; controles $2.6 \pm 0.8 \times 10^3$ /mL; $p < 0.05$). Al igual que pasaba con los neutrófilos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos con EPOC ($p > 0.05$). Figura 18.

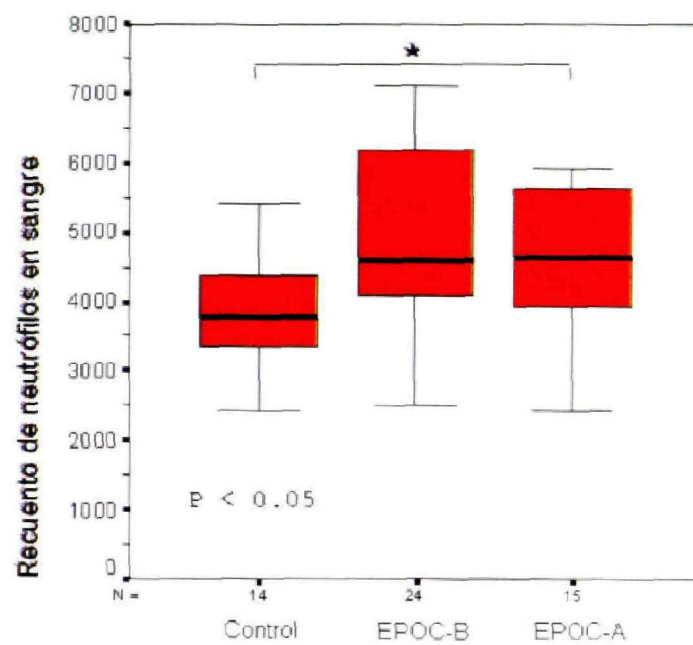


Figura 17. Recuento de neutrófilos en sangre (/mL).

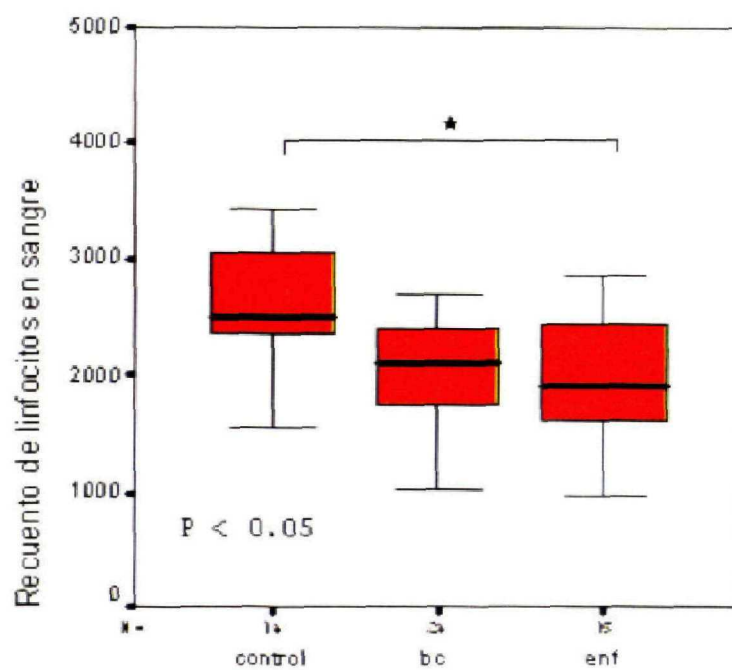


Figura 18. Recuento de linfocitos en sangre (/mL)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de eosinófilos entre los tres grupos (EPOC-A $0.17 \pm 0.09 \times 10^3$ /mL; EPOC-B $0.2 \pm 0.1 \times 10^3$ /mL; controles $0.18 \pm 0.1 \times 10^3$ /mL; $p > 0.05$) como se muestra en el gráfico de cajas. Figura 19.

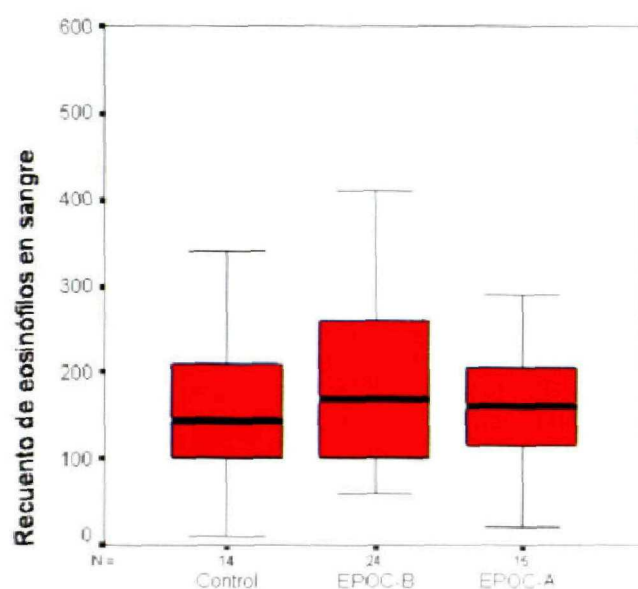


Figura 19. Recuento de eosinófilos en sangre (/mL).

Niveles de proteína C reactiva de alta sensibilidad

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCR) entre los pacientes con EPOC y el grupo control (EPOC-A 3.5 ± 5.4 mg/L; EPOC-B 7.1 ± 13 mg/L; control 2.1 ± 1.5 mg/L; $p > 0.05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas considerando como un único grupo los pacientes con EPOC (EPOC-A y B 5.7 ± 11.2 mg/L; control 2.1 ± 1.5 mg/L; $p > 0.05$). Figura 20 y 21.

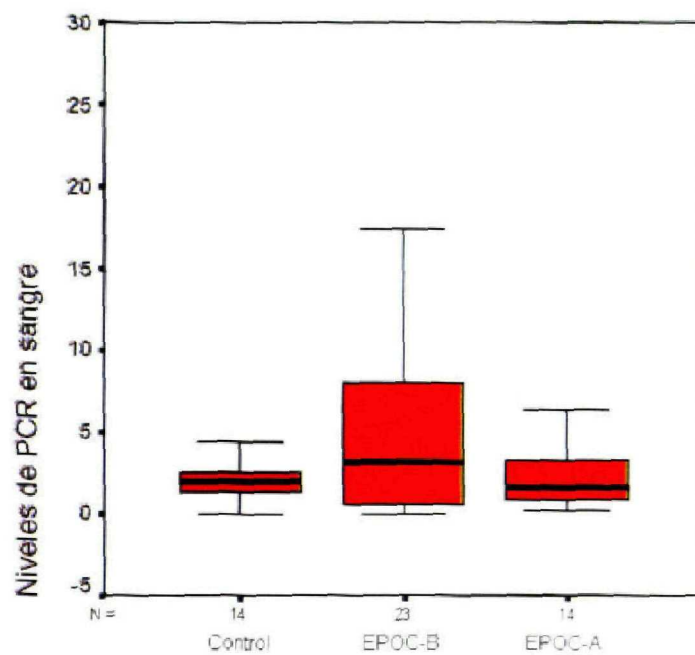


Figura 20. Niveles de proteína C reactiva en sangre (mg/L).

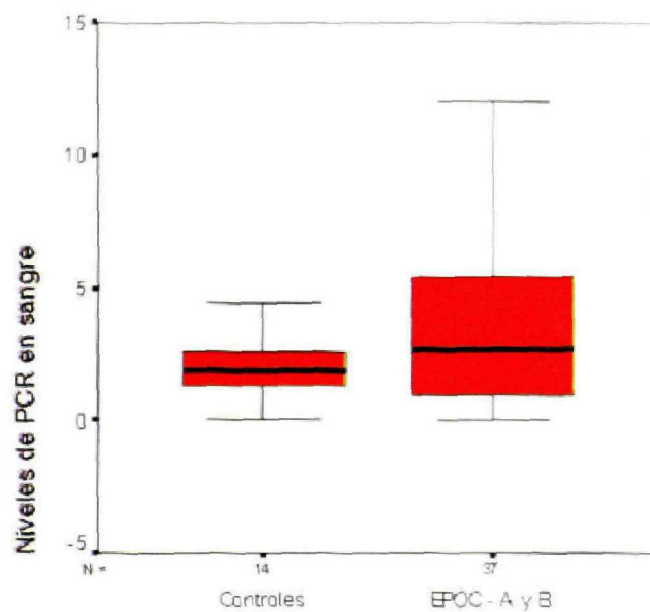


Figura 21. Niveles de proteína C reactiva en sangre (mg/L) .

Inmunoglobulina E total

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (EPOC-A 43 ± 53 mg/L; EPOC-B 134 ± 168 mg/L; control 193 ± 240 mg/L; $p > 0.05$). Figura 22.

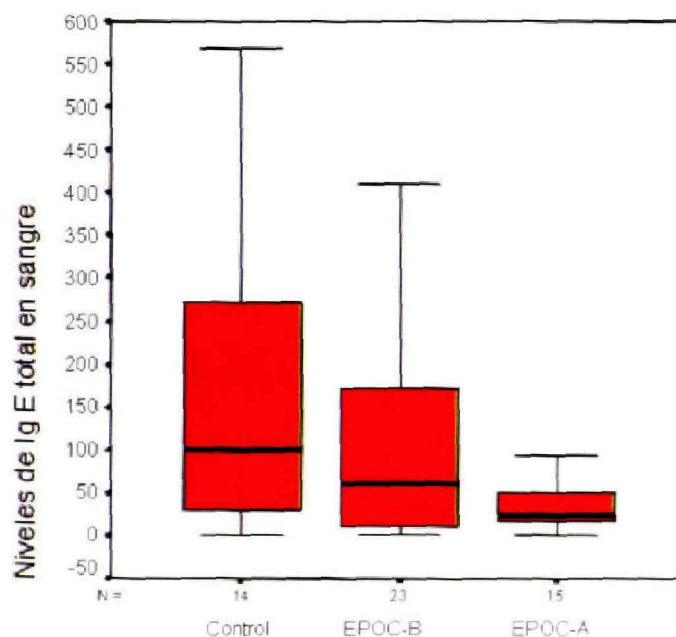


Figura 22. Niveles de Ig E total en sangre (mg/L).

Valores del fibrinógeno en sangre

Los niveles de fibrinógeno estaban aumentados en los pacientes con EPOC comparado con los controles (EPOC-A 350 ± 102 mg/dL; EPOC-B 348 ± 183 mg/dL; control 247 ± 118 mg/dL; $p = 0.03$), si bien no se encontraron diferencias entre ambos fenotipos de EPOC ($p > 0.05$). Figura 23.

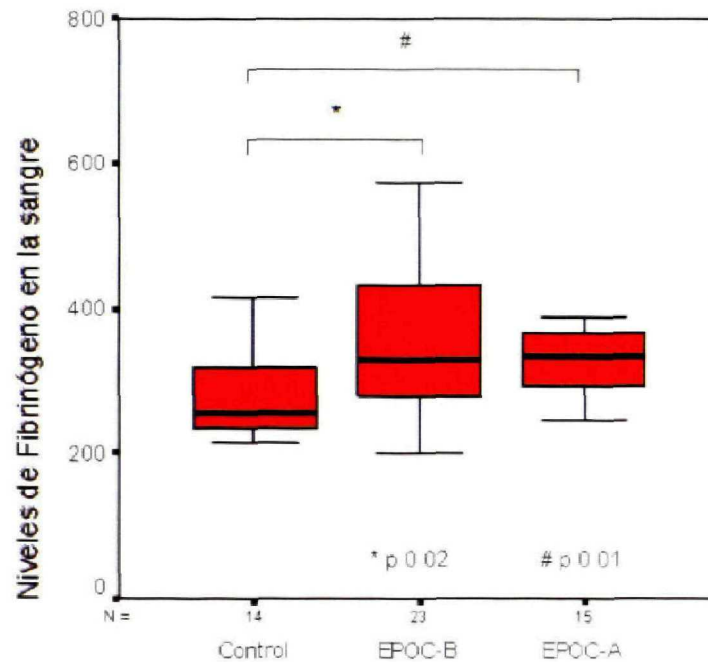


Figura 23. Niveles de fibrinógeno en sangre (mg/dL).

Valores de hemoglobina (Hb) y proteínas totales

Los niveles de hemoglobina (EPOC-A 14.8 ± 1.4 g/dL; EPOC-B 14.7 ± 1.5 g/dL; control 15.6 ± 1.1 g/dL; $p = 0.08$; figura 24) y de proteínas totales (EPOC-A 73.2 ± 4.8 g/L; EPOC-B 69.1 ± 16.5 g/L; control 70.8 ± 3.6 g/L; $p = 0.44$; figura 25) fueron similares en los tres grupos no encontrando diferencias significativas.

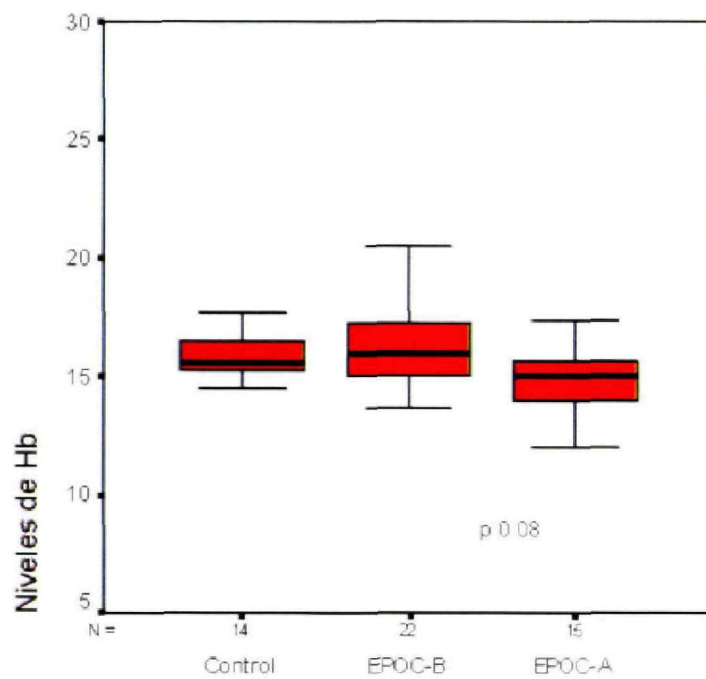


Figura 24. Niveles de hemoglobina (g/dL).

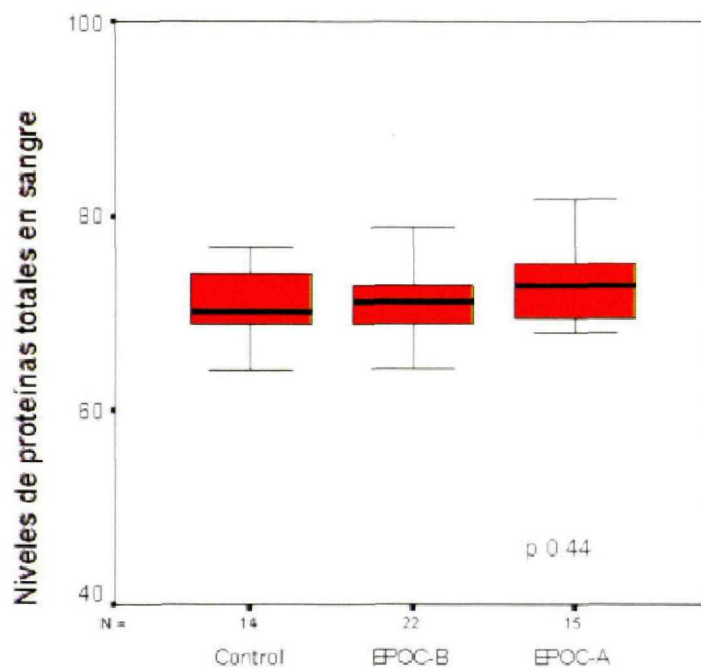


Figura 25. Niveles de proteínas totales en sangre (g/L).

Niveles de interleucina 8 (IL-8) en sangre.

Los niveles de IL-8 en suero estaban más elevados en los pacientes con EPOC comparado con los controles (EPOC-A 27.7 ± 14.1 pg/mL; EPOC-B 29.6 ± 3.5 pg/mL; control 13.4 ± 7.8 pg/mL; $p = 0.003$). El fenotipo en el que predominaba el enfisema era el que tenía unos niveles más altos y aunque no se logró alcanzar la significación estadística ($p = 0.06$) existe una tendencia que posiblemente con una muestra más grande sí se hubiese alcanzado. Figura 26.

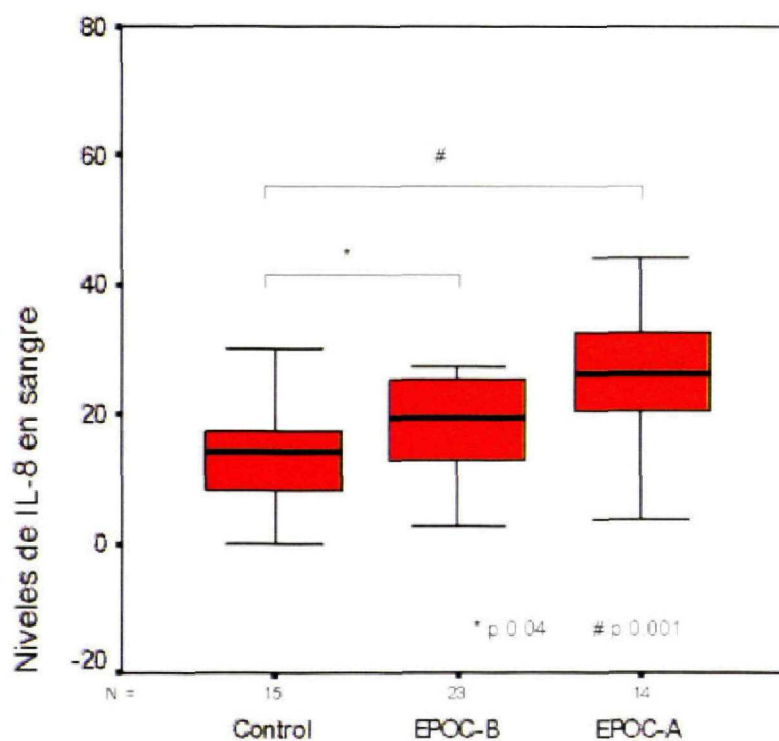


Figura 26. Niveles de interleucina 8 en sangre (pg/ml).

Niveles de leucotrieno B4 (LTB4) en sangre

Los niveles de LTB4 estaban significativamente más elevados en el grupo control y EPOC con predominio de bronquitis crónica comparado con el grupo EPOC en el que predominaba el enfisema (EPOC-A 12.6 ± 21.8 pg/mL; EPOC-B 33.9 ± 25.15 pg/mL; control 27.5 ± 26.5 pg/mL; $p = 0.004$).

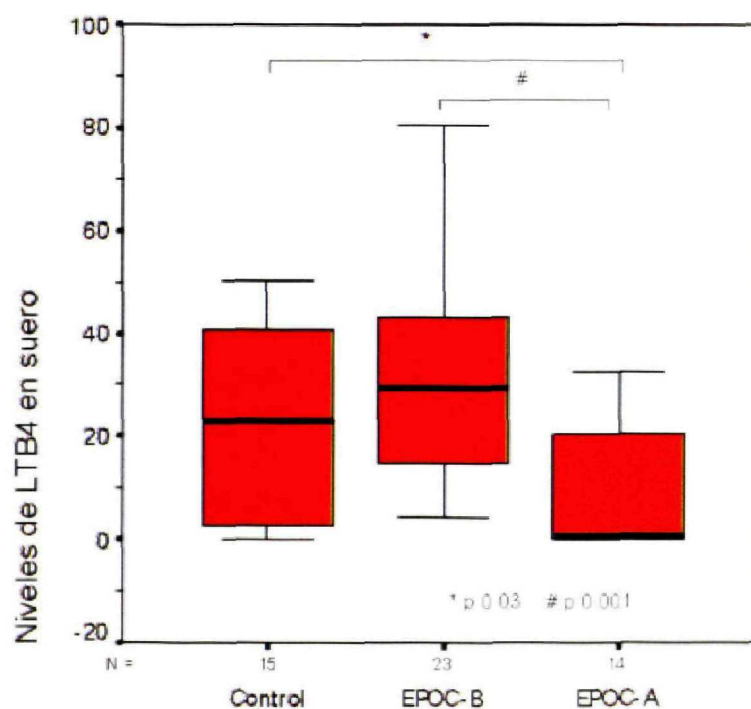


Figura 27. Niveles de leucotrieno B4 en sangre (pg/ml).

Niveles de 8 isoprastano (8-ISO) en sangre

Los niveles de 8-ISO estaban ligeramente aumentados en el grupo EPOC-B comparado con los otros grupos EPOC-A y control aunque no

se encontraron diferencias estadísticamente significativas (EPOC-A 3.9 ± 10.1 pg/mL; EPOC-B 6.5 ± 9.2 pg/mL; control 3.0 ± 5.8 pg/mL; $p = 0.09$).

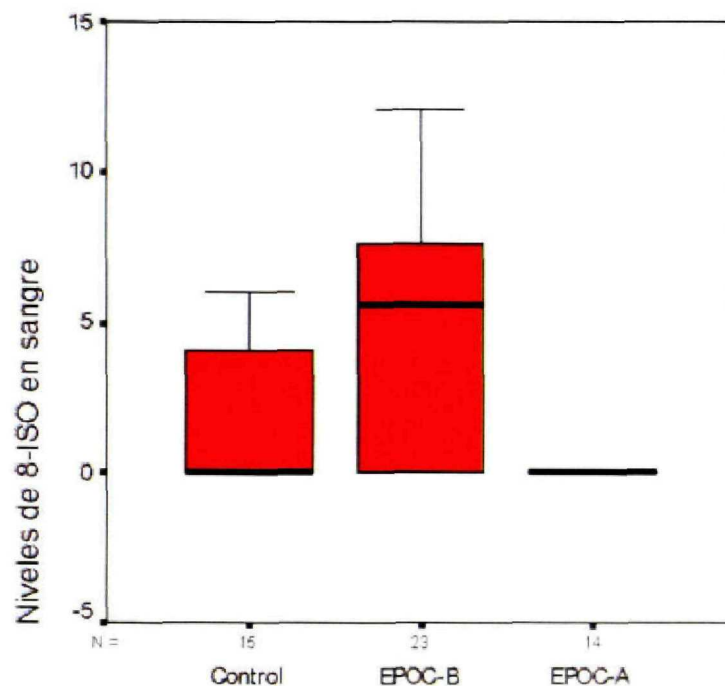


Figura 28. Niveles de 8 isoprostano en sangre (pg/ml).

Volumen del condensado recogido

Se prestó especial interés en la metodología para que no variase la duración de la prueba (15 minutos), las condiciones de temperatura y humedad, así como la técnica de recogida. La cantidad de condensado recogido fue muy similar en todos los grupos (EPOC-A 1.8 ± 0.7 ml; EPOC-B 2.4 ± 1.2 ml; control 2.0 ± 0.8 ml; $p > 0.05$) no encontrando diferencias significativas. Figura 29.

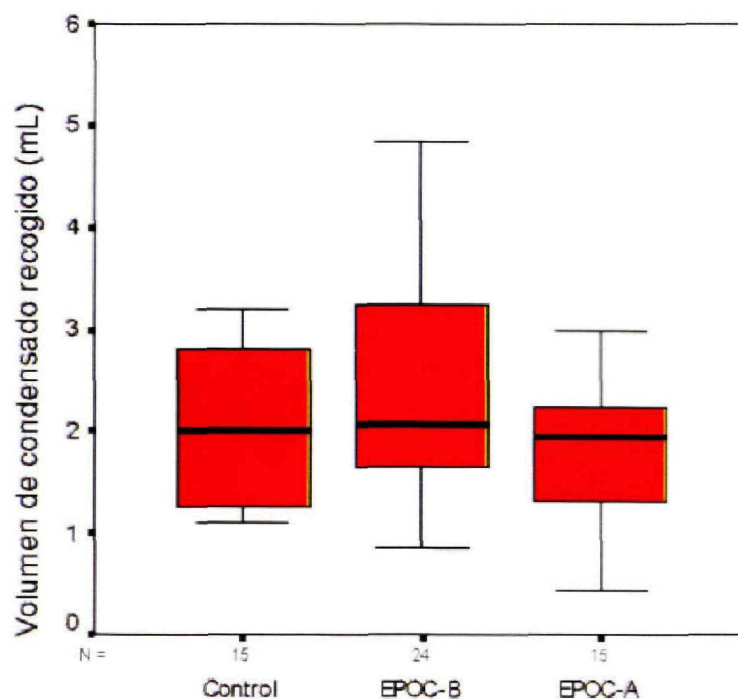


Figura 29. Volumen de condensado recogido (ml).

Valores del pH en el condensado de aire exhalado

Los valores del pH eran inferiores en los pacientes diagnosticados de EPOC comparados con los controles como puede apreciarse en el gráfico (pH EPOC-A 5.7 ± 0.3 ; EPOC-B 5.9 ± 0.5 ; control 6.3 ± 0.6 ; $p = 0.03$), sin embargo no se encontraron diferencias entre los diferentes fenotipos de EPOC ($p > 0.05$). Los valores obtenidos se encuentran un punto por debajo de los resultados presentados en otras publicaciones. Esto probablemente se deba a que nosotros no desaireamos la muestra.

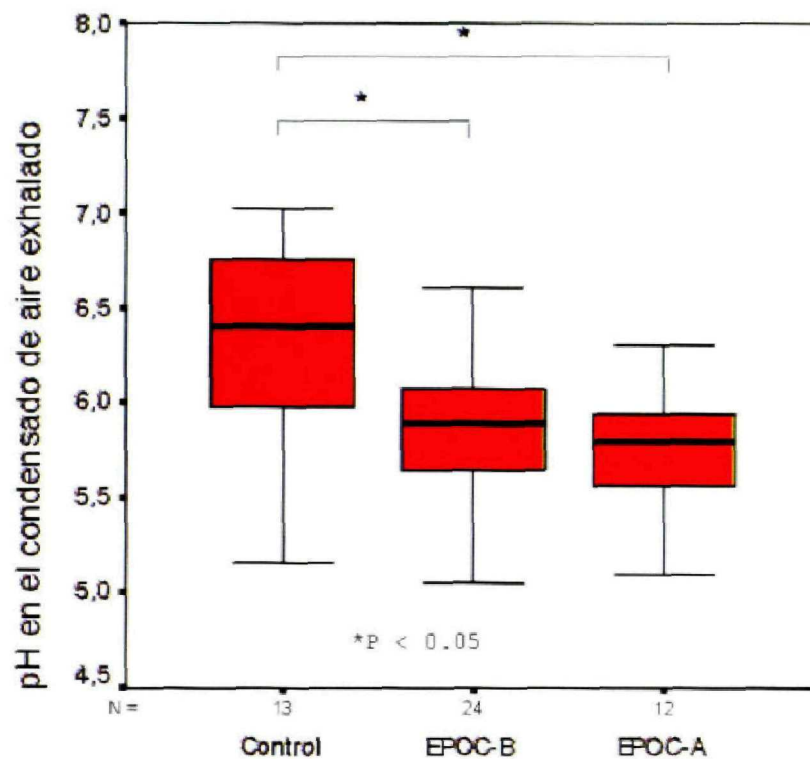


Figura 30. Valores del pH en el condensado.

Niveles de IL-8 en el condensado de aire exhalado

Los niveles de la IL-8 estaban disminuidos en el grupo EPOC-A, siendo apenas detectables, comparado con el grupo EPOC-B y control. Estas diferencias fueron significativas (EPOC-A 0.34 ± 0.69 pg/mL; EPOC-B 2.4 ± 3.1 pg/mL; control 3.1 ± 4.6 pg/mL; $p = 0.006$) No se encontraron diferencias entre el fenotipo con predominio de bronquitis crónica y los controles ($p > 0.05$). Figura 31.

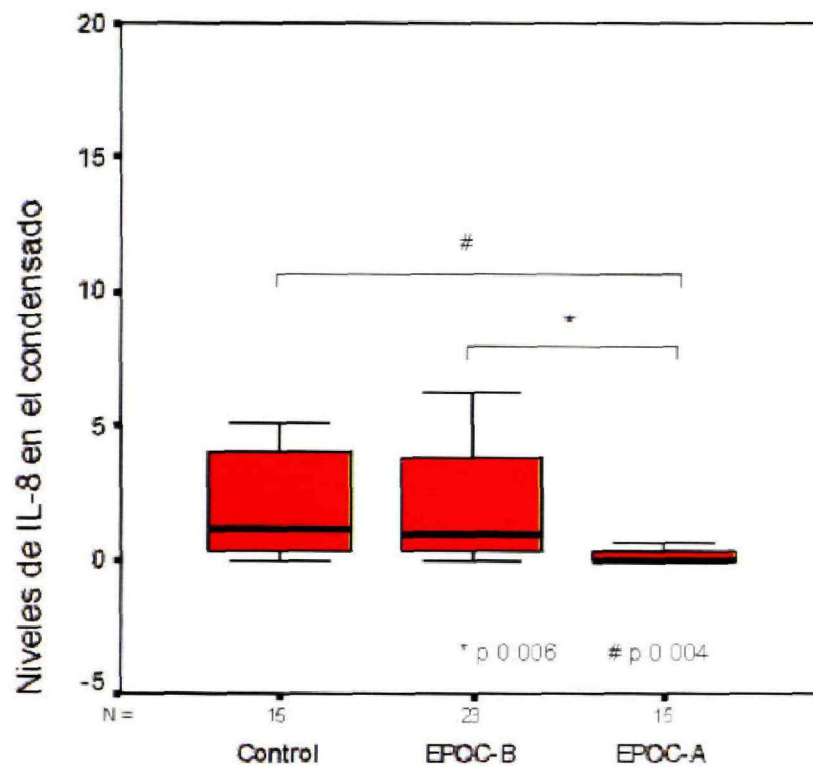


Figura 31. Niveles de interleucina 8 en el condensado.

Niveles de LTB4 en el condensado de aire exhalado

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de LTB4 en el condensado recogido en los tres grupos (EPOC-A 0.42 ± 1.29 pg/mL; EPOC-B 1.1 ± 1.9 pg/mL; control 0.9 ± 1.3 pg/mL; $p > 0.05$). Figura 32.

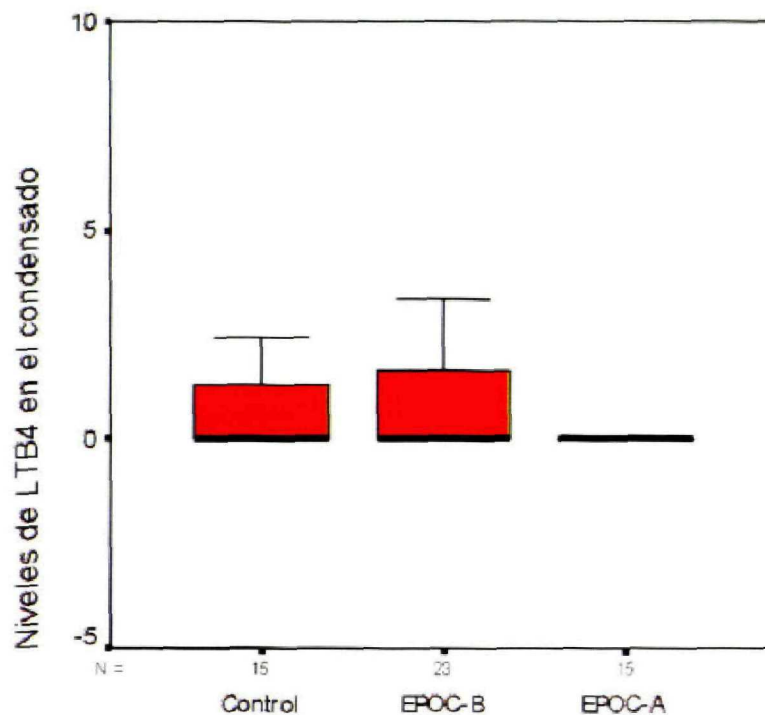


Figura 32. Niveles de leucotrieno B4 en el condensado.

Niveles de 8-ISO en el condensado de aire exhalado

Los niveles de 8-ISO estaban disminuidos en el grupo EPOC-A comparado con el resto de los grupos siendo estas diferencias significativas (EPOC-A 0.06 ± 0.26 pg/mL; EPOC-B 1.7 ± 3.0 pg/mL; control 1.9 ± 2.8 pg/mL; $p = 0.01$). Figura 33.

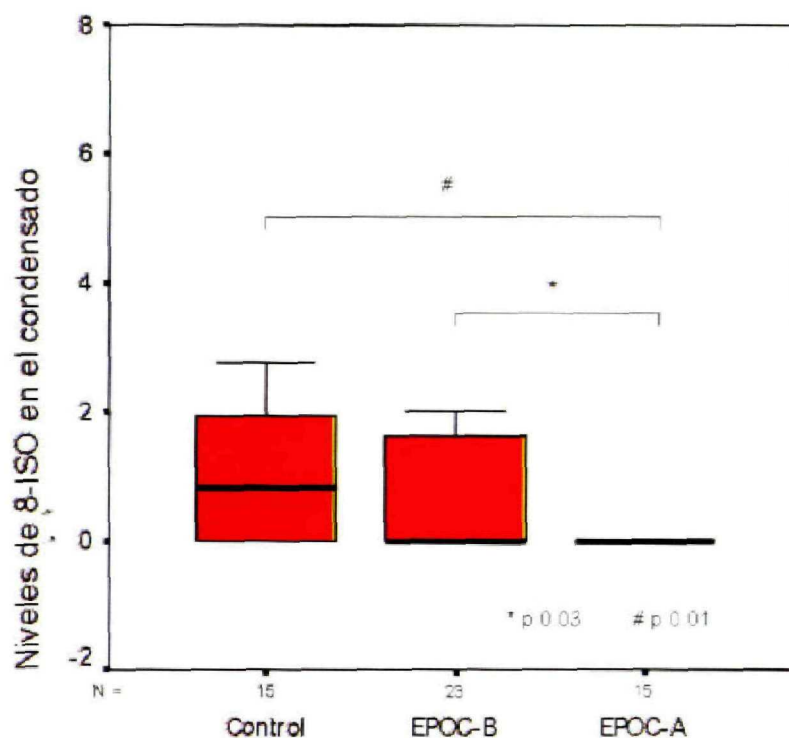


Figura 33 . Niveles de 8 isoprostano en el condensado.

Relaciones entre las variables

Los niveles de IL-8, LTB4 y de 8-ISO en el CAE se correlacionaron significativamente con los valores de TLCO/VA% ($r = 0.30$, $p < 0.05$; $r = 0.29$, $p < 0.05$; y $r = 0.46$; $p < 0.01$ respectivamente) pero no con el FEV1. Existió una correlación negativa significativa entre IL8 ($r = -0.31$; $p < 0.05$) y 8-ISO ($r = -0.51$; $p < 0.001$) en suero y CAE. Sin embargo, esta correlación no fue significativa para LTB4. No se demostraron diferencias significativas para IL-8, LTB4, o 8-ISO en suero y CAE entre fumadores activos y ex-fumadores.

Observamos también una correlación inversa entre la puntuación general de enfisema en la radiografía de tórax y los valores de TLCO/VA% ($r = -0.770$, $p < 0.001$), FEV1 ($r = -0.381$, $p < 0.05$), IMC ($r = 0.316$, $p < 0.05$), LTB4 en sangre ($r = 0.359$, $p < 0.01$) y 8-ISO en condensado respectivamente ($r = -0.293$, $p < 0.05$). Existía una correlación directa entre la puntuación radiológica y el VR ($r = 0.310$, $p < 0.05$), la escala de disnea ($r = 0.597$, $p < 0.001$) y el índice paquete año ($r = 0.350$; $p < 0.01$).

11. DISCUSIÓN

En nuestro estudio observamos que los pacientes analizados con una limitación crónica al flujo aéreo similar manifiestan niveles de inflamación diferentes dependiendo de la presencia o ausencia de enfisema. Los pacientes fueron seleccionados en base a criterios funcionales ($FEV_1 < 80\%$ y $FEV_1/FVC < 70\%$). Utilizamos estos criterios ya que definen a la mayoría de los pacientes con EPOC. Los pacientes fueron divididos en diferentes fenotipos en función sus características clínicas, técnicas de imagen y funcionales (KCO).

La edad de los pacientes diagnosticados de EPOC era prácticamente idéntica en ambos fenotipos. En los pacientes en los que predominaba el enfisema los valores del IMC eran más bajos y los valores en la escala de disnea eran más altos que los de los pacientes con predominio de bronquitis crónica.

Los síntomas de bronquitis crónica estaban presentes en todos los pacientes con fenotipo de bronquitis crónica pero no en los pacientes con fenotipo de enfisema.

Los pacientes con predominio de bronquitis crónica tenían unos valores del FEV_1 y FEV_1/FVC similares a los pacientes en los que predominaba el enfisema. Los valores de TLC y RV estaban ligeramente aumentados en los pacientes con enfisema aunque las

diferencias no alcanzaron la significación estadística. Los valores de la DLCO y sobre todo la KCO eran mucho más bajos en los pacientes con predominio de enfisema comparado con el otro grupo en el que predomina el fenotipo de bronquitis crónica, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

La capacidad de difusión de CO corregida para volumen alveolar (KCO) ha demostrado ser, junto con las técnicas de imagen, especialmente la tomografía axial computarizada de alta resolución, una herramienta útil a la hora de clasificar estos fenotipos (25-28). En nuestro estudio los valores de KCO estaban sólo disminuidos en los pacientes con predominio de enfisema. La disminución de la KCO es una anomalía fisiológica relacionada con el enfisema y se ha demostrado que se correlaciona con la extensión del enfisema. Encontramos también una correlación inversa entre los valores de la KCO y el consumo de cigarrillos expresado por el índice paquete año.

En relación a las pruebas de imagen, se ha demostrado que la radiografía de tórax convencional es útil para la valoración clínica del enfisema (129). El hecho de que en este estudio se haya obtenido una puntuación mayor en la radiografía de tórax para enfisema y una menor para los pacientes con predominio de bronquitis crónica confirma que esta prueba también puede ser de utilidad para diferenciar estos fenotipos. La radiografía de tórax convencional es

utilizada de forma rutinaria en la valoración de los pacientes con EPOC. Sin embargo, su utilidad en la valoración del enfisema es todavía controvertida. La mayoría de las controversias que existen respecto a esta técnica tienen su origen en que los resultados obtenidos procedían de estudios en los que se comparaban las imágenes de las radiografías con el examen postmortem de pulmones hiperinsuflados (130-134). El acuerdo entre la evaluación radiológica y patológica del enfisema varía de excelente (131-132) a pobre (130, 134) dependiendo de la selección de los pacientes y criterios radiológicos utilizados para diagnosticar enfisema. Durante los últimos 10 años la tomografía axial computarizada (TC) ha confirmado que es el método de imagen más sensible para diagnosticar a los pacientes de enfisema in vivo. Estas conclusiones se basan en los resultados de varios estudios que utilizan un método de análisis cualitativo y cuantitativo de imágenes de TC y las comparan con estudios histológicos de piezas de pulmón obtenidos en actos quirúrgicos o en autopsias. Desafortunadamente en estos estudios no se incluyó la radiografía de tórax convencional como parte del protocolo o no se detallaron los resultados en los artículos publicados (135-138). Aunque la TC es superior a la radiografía de tórax convencional en la detección del enfisema leve es cuestionable si debería sustituir a la radiografía convencional en la evaluación clínica del enfisema en los pacientes con EPOC. En el

artículo de Miniati se demuestra que la información obtenida de la lectura de una radiografía de tórax utilizando una metodología adecuada y apoyada por otras variables, tanto clínicas como funcionales, son tan valorables como la información obtenida mediante una TC (129). Estos hallazgos son relevantes en la relación coste beneficio ya que la radiografía de tórax es con mucho más barata y asequible. Además, la dosis de radiación que recibe el sujeto es mucho menor. En base a esto la radiografía sigue siendo el método de elección para evaluar en los pacientes con EPOC la presencia o ausencia de enfisema apoyado por la prueba de difusión de CO corregida para VA, quedando reservada la TC de tórax para situaciones especiales como previa a la cirugía de resección de volumen, bullectomía y trasplante pulmonar.

Otros autores han confirmado ya con anterioridad las diferencias que existen entre diferentes fenotipos de EPOC utilizando técnicas de imagen como la TC de tórax y parámetros clínicos para clasificar los fenotipos de EPOC, confirmando la existencia de diferencias constitucionales entre los pacientes con predominio de bronquitis crónica y enfisema (139-140).

En nuestra muestra las concentraciones de marcadores inflamatorios estaban elevadas en el suero de los pacientes diagnosticados de EPOC. El recuento de neutrófilos, los niveles de fibrinógeno y los

niveles de IL-8 estaban aumentados comparados con el grupo control. Los niveles de LTB4 eran mayores en el grupo control y EPOC con predominio de bronquitis crónica comparado con los que tenían predominio de enfisema.

Las interleucinas juegan un papel muy importante en la cadena de la inflamación, siendo de especial interés la IL-8 en los pacientes diagnosticados de EPOC. La IL-8 es un mediador inflamatorio que interviene en la activación de sustancias quimiotácticas y de activación de neutrófilos. Esto puede explicar porqué el número de neutrófilos se encuentra elevado en este tipo de pacientes.

El LTB4 también actúa como mediador inflamatorio y quimiotáctico estimulando la formación de radicales libres y la liberación de enzimas lisosómicas. En otros estudios también se han descrito niveles elevados de LTB4 en fumadores sanos comparado con no fumadores aunque a niveles más bajos que los pacientes con EPOC (83). En nuestro estudio también se confirman estos hallazgos, pero a la hora de dividir los pacientes con EPOC en dos fenotipos diferentes volvemos a encontrar diferencias. Los niveles en los pacientes con enfisema eran incluso más bajos que en los fumadores sanos. En los estudios previamente mencionados no se subdividió a los pacientes con EPOC en sus dos fenotipos principales lo cual puede explicar estas diferencias. En el suero del grupo con predominio de bronquitis

crónica también estaban aumentados los niveles de 8-ISO comparados con el resto, pero no alcanzó significación estadística.

En el condensado de aire exhalado llama la atención que tanto los marcadores de inflamación (IL-8) como de estrés oxidativo (8-ISO) estaban disminuidos en el grupo con enfisema comparado con el resto de los grupos.

Los valores del pH del condensado estaban disminuidos en los grupos con EPOC comparado con los controles, no existiendo diferencias entre ambos fenotipos. Los resultados obtenidos concuerdan con el de otros estudios previamente publicados, en los que se confirma la existencia de un pH más ácido en los pacientes con EPOC comparado con los controles (83). Los valores obtenidos del pH eran inferiores proporcionalmente en todos los grupos a los valores que se han publicado en otros trabajos (92). Esto se podría explicar porque el condensado no fue procesado (gaseado con helio) antes de su análisis para evitar la potencial pérdida de marcadores inflamatorios.

Estos resultados junto con la falta de correlación positiva entre los valores de IL-8, LTB-4 y 8-ISO en el condensado y suero sugiere que los niveles de marcadores y estrés oxidativo pueden ser diferentes a nivel local y sistémico.

Hasta el momento, todos los estudios que han analizado la respuesta inflamatoria y el grado de estrés oxidativo en pacientes con EPOC no han tenido en cuenta las diferencias en las lesiones en el parénquima y en las vías aéreas que puedan traducirse en una respuesta inflamatoria diferente a nivel local y sistémico.

Si el origen de la inflamación sistémica se localiza en el pulmón esto justificaría por qué el uso de una medicación antiinflamatoria, como los corticoides inhalados, presenta una respuesta antiinflamatoria a nivel sistémico. El enfisema se caracteriza por la pérdida del parénquima pulmonar, alvéolos, capilares y pequeñas vías aéreas, lo que podría interpretarse como una menor carga inflamatoria y estrés oxidativo a nivel sistémico. Sin embargo, los hallazgos obtenidos en nuestro estudio no apoyan esta hipótesis ya que la carga inflamatoria representada por el número de neutrófilos, fibrinógeno, proteína C reactiva e IL-8 era similar en ambos grupos a excepción del LTB₄ que era inferior.

Otra posibilidad es que el origen de la inflamación a nivel pulmonar tuviese un origen sistémico. Nuestros resultados confirman que existen diferencias entre los grupos con EPOC y los controles a nivel sistémico, pero no encontramos diferencias entre los dos fenotipos de EPOC. Si se encontraron diferencias entre los dos fenotipos de EPOC en los marcadores inflamatorios en el condensado, estando prácticamente

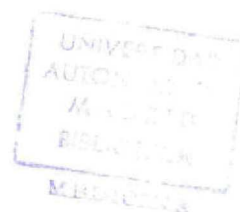
ausentes en los pacientes con enfisema y de ser el origen de la inflamación sistémica es lógico pensar que en ambos grupos deberían estar elevados.

Una tercera posibilidad es que el origen de la inflamación tanto a nivel local como sistémico fuesen los componentes del humo del tabaco. Algunos autores han demostrado que el consumo de cigarrillos asociado a un FEV1 reducido se relaciona con un aumento de los marcadores inflamatorios a nivel sistémico y complicaciones donde se incluyen la caquexia y aumento de la morbilidad y mortalidad cardiovascular. Abandonar el consumo ha demostrado que ayuda a reducir los niveles en sangre de algunos marcadores, pero esta medida por sí misma es insuficiente para normalizar completamente los niveles en sangre de la PCR y otros biomarcadores inflamatorios, una vez que el deterioro de la función pulmonar se ha establecido (141,142). En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre IL-8, LTB4 y 8-ISO en el suero y el condensado de fumadores activos y exfumadores. Además, los marcadores inflamatorios en el grupo control que eran todos fumadores estaban disminuidos, lo cual no apoya esta hipótesis, si bien estas personas no habían desarrollado obstrucción al flujo aéreo.

La inflamación, tanto a nivel local como sistémico, por sí misma no

explica de forma satisfactoria la evolución de los pacientes con enfisema. Los principales mecanismos que hoy en día se piensa que son responsables del origen y progresión del enfisema incluyen la hipótesis de proteasas-antiproteasas, inflamación, estrés oxidativo y remodelado de la matriz (143). Es posible que estos no sean procesos completamente distintos y que cada uno contribuya al desarrollo de una enfermedad compleja. Durante los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo para describir los procesos inflamatorios en el enfisema, no obstante, es posible que la inflamación pueda actuar como un desencadenante de una cascada de acontecimientos que culminan con la destrucción del tejido pulmonar, que es lo más característico de esta enfermedad. Existen mecanismos complejos en los que la inflamación, el remodelado, las fuerzas mecánicas y las alteraciones de la matriz, especialmente de las fibras colágenas, van a jugar un papel muy importante en la progresión de la enfermedad.

Por lo tanto, es posible que tanto la respuesta local como sistémica puedan tener características específicas y ser relativamente independientes del humo del tabaco. Una vez desencadenada la cascada inflamatoria por el humo del tabaco a nivel local ésta puede persistir a pesar de abandonar el consumo del mismo como se ha demostrado en estudios previos (141).



EL uso de corticoides inhalados (CI) en base a que la EPOC es una enfermedad inflamatoria proporciona un uso racional de los mismos, de hecho, en Estados Unidos, es una de las principales medicinas prescritas en este tipo de pacientes. No obstante, los corticoides incluso a altas dosis, ya sean inhalados o por vía sistémica, no suprimen el componente inflamatorio en este tipo de pacientes (144,145). Esta falta de efecto puede deberse al hecho de que los corticoesteroides aumenten la supervivencia de los neutrófilos y no supriman la inflamación en la EPOC (146,147). Los estudios con corticoides inhalados no han demostrado que eviten la progresión de la enfermedad (148-150). Sin embargo, varios estudios han demostrado los efectos beneficiosos de los corticoides inhalados reduciendo los síntomas, disminuyen el número y la gravedad de las exacerbaciones, mejoran la función pulmonar y la calidad de vida (151- 159). Existen datos a favor de que los corticoides inhalados puedan mejorar la supervivencia de estos pacientes, si bien estos datos quedan pendientes de ser verificadas por otros estudios, como es el estudio TORCH (160). No obstante en todos estos trabajos de investigación no se fenotipó a los pacientes.

Se ha demostrado que el uso de corticoides inhalados puede interferir en los resultados de los mediadores hallados en el condensado de los pacientes asmáticos, esto es más controvertido en los pacientes con

EPOC (83). Los estudios que han analizado el efecto de los corticoides inhalados sobre los marcadores inflamatorios (pH, PGE2 y LTB4) aislados en el condensado no han encontrado diferencias entre los pacientes que recibían dicho tratamiento y los que no. No obstante, todos nuestros pacientes recibían tratamiento con corticoides inhalados y el impacto de este tratamiento fue poco relevante en los niveles de mediadores analizados en el condensado.

Nuestro estudio debe considerarse un estudio piloto y teniendo en cuenta sus limitaciones, sugiere que para el mismo grado de limitación al flujo aéreo los pacientes con enfisema tienen unos niveles de marcadores inflamatorios menores que los pacientes con predominio de bronquitis crónica. Esto puede justificarse por la destrucción del parénquima, vasos y pequeñas vías aéreas y también puede explicar porqué estos pacientes responden peor al tratamiento.

Aunque en los pacientes con EPOC los dos componentes de limitación al flujo aéreo, enfermedad de la pequeña vía aérea (bronquiolitis obstructiva) y destrucción del parénquima pulmonar (enfisema) a menudo coexisten, podría ser clínicamente relevante distinguir a los pacientes con un fenotipo en el que predomina el enfisema. Por este motivo, puede considerarse una limitación importante de este estudio que actualmente no existe ningún punto

de corte bien establecido que nos permita distinguir entre EPOC tipo enfisema o bronquitis crónica. No obstante, en el diseño de nuestro estudio se seleccionaron a casos bien definidos intentando evitar al máximo el solapamiento entre ambos fenotipos.

Otra limitación a tener en cuenta, es que hasta el momento la técnica de recogida y análisis del condensado de aire exhalado no ha sido estandarizada, si bien se ha realizado un gran esfuerzo en los últimos años en depurar la técnica que ha concluido en una reciente publicación de consenso por parte de la Sociedad Europea y Americana de Neumología y Cirugía Torácica (92). También hemos comprobado que los kit de análisis utilizados hasta el momento han sido diseñados para el estudio de marcadores séricos, siendo la concentración de los mismos muy inferior en el condensado por lo que algunos autores (83) recomiendan mejorar la sensibilidad de los kit de ELISA utilizados para el análisis de los marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo.

El uso de técnicas no invasivas como el análisis del esputo inducido y del óxido nítrico exhalado ha demostrado ser de utilidad para el estudio de la inflamación en enfermedades pulmonares que cursan con limitación al flujo aéreo. El análisis del condensado de aire exhalado ha levantado numerosas expectativas por su facilidad de obtención y posibilidad de ser utilizada en cualquier paciente, pero

es una técnica en la que tanto la estandarización del procedimiento de recogida como de los sistemas de análisis deben ser mejorados. Otro factor a tener en cuenta es el tiempo utilizado en el análisis de las muestras que limita su uso en la práctica clínica diaria. La incorporación de analizadores al condensador que permitan y aceleren la detección de los marcadores de inflamación y estrés oxidativo (pH, H_2O_2) facilitaría la posibilidad, una vez estandarizada la técnica, de ser incorporados a la práctica clínica.

Distinguir los diferentes fenotipos que forman parte de la EPOC puede ser útil en la práctica clínica ya que podría ayudarnos a definir mejor la historia natural de la enfermedad, así como a enfocar mejor las estrategias diagnósticas y terapéuticas para los diferentes fenotipos de EPOC.

12. CONCLUSIONES

1. Los resultados de este estudio sugieren que en una población homogénea de pacientes con EPOC la presencia de un predominio enfisematoso disminuye el nivel de inflamación y de estrés oxidativo en el pulmón.
2. Aunque en la práctica clínica existe un elevado número de pacientes con un importante grado de solapamiento, en los que las diferencias pueden no ser tan evidentes, tener en consideración estos hallazgos puede ser relevante para poder interpretar todos los aspectos relacionados con la patogenia y respuesta al tratamiento de estos pacientes.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Barberà JA, Peces-Barba G, Agustí AGN, Izquierdo JL, Monsó E, Montemayor T et al. Guía clínica para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Arch Bronconeumol 2001;37:297-316.
2. Oudijk EJD, Lammers JWJ, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. Eur. Respir. J. 2003; 22: 5S - 13s
3. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. BMJ 1977; 1: 1645–1648.
4. BTS guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. The COPD Guidelines Group of the Standards of Care Committee of the BTS. Thorax 1997; 52: Suppl. 5, 1s–28s.
5. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: S77–S121.
6. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease

- (COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1995; 8: 1398–1420.
7. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PMA, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1256-1276
 8. National Heart LaBl. Morbidity & Mortality: 2002 Chartbook on Cardiovascular, Lung and Blood Diseases. www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/02_chtbk.pdf 2002. Date updated: May 2002; Date accessed: November 2002.
 9. Sobradillo Peña V, Miratvilles M., Gabriel R, Jiménez-Ruiz CA, Villasante C, Masa JF, Viejo JL, Fernández-Fau L. Geographical variations in prevalence and underdiagnosis of COPD. Results of the IBERPOC multicentre epidemiologic study. *Chest* 2000; 118: 981-989.
 10. Izquierdo JL The burden of COPD in Spain: results from the confronting COPD survey. *Respir Med* 2003; 97 (Suppl C): S61-S69.
 11. Hurd S. The impact of COPD on Lung Health Worldwide. *Chest* 2000; 117: 1S-4S.

12. Wedzicha JA. The heterogeneity of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2000;55:631–632.
13. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: Suppl. 10, S28–S38.
14. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 852–857.
15. Turato G, Zuin R, Miniati M, et al. Airway inflammation in severe chronic obstructive pulmonary disease: relationship with lung function and radiologic emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 105–110.
16. Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1968; 278: 1355–1360.
17. Wright JL, Cagle P, Churg A, Colby TV, Myers J. Diseases of the small airways. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 240–262. 7 Shaw RJ, Djukanovic R, Tashkin DP, Millar AB, du Bois RM, Orr PA. The role of small airways in lung disease. *Respir Med* 2002; 96: 67–80.
18. McLean A, Warren PM, Gilleooly M, MacNee W, Lamb D.

- Microscopic and macroscopic measurements of emphysema: relation to carbon monoxide gas transfer. *Thorax* 1992; 47: 144–149.
19. Löfdahl JM, Cederlund K, Nathell L, Eklund A, Sköld CM. Bronchoalveolar lavage in COPD: fluid recovery correlates with the degree of emphysema *Eur Respir J* 2005; 25: 275–281.
 20. MacNee W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the ATS*, November 1, 2005; 2(4): 258 - 266.
 21. Vestbo J, Lange P. Can GOLD stage 0 provide information of prognostic value in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:329–332.
 22. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 1990;85:682–689.
 23. Shao MXG, Nakanaga T, Nadel JA. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor α converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L420–L427.

24. Snider GL, Kleinerman LJ, Thurlbeck WM, Bengali ZH. The definition of emphysema: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985;132: 182–185.
25. Kim WD, Eidelman DH, Izquierdo JL, Ghezzi H, Saetta MP, Cosio MG. Centrilobular and panlobular emphysema in smokers: two distinct morphologic and functional entities. *Am Rev Respir Dis* 1991;144: 1385–1390.
26. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364:709–721.
27. Izquierdo JL, Sánchez I, Fernández J, Castela J, Carrillo F, Gallardo J. Utility of transfer factor to detect different bronchodilator responses in patients with COPD. *Respiration*. 1998; 65: 282-288.
28. Izquierdo Alonso J.L.: EPOC y asma. *Arch Bronconeumol* 2001; 37: 1-2.
29. Gross NJ. Outcome measurements in COPD. *Chest* 2003; 123: 1325-1327.
30. Saetta M, Kim WD, Izquierdo JL, Ghezzi H, Cosio MG. Extent of centrilobular and panlobular emphysema in smokers' lungs:

pathological and mechanical implications. *Eur Respir J* 1994; 7: 664-671.

31. Gessner C, Scheibe R, Wotzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Engelmann L, Hoheisel G, Gillissen A, Sack U, Wirtz H. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2005 Oct; 99:1229-40.
32. Almonacid C, Izquierdo JL. Volumen pulmonares estáticos, resistencias y distensibilidad pulmonar en la patología obstructiva. *Estructura y función. Estudio de la función respiratoria.. Sanitaria* 2000. 2004. Vol 2. 121-135
33. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J*. 2004; 23 :932-46
34. Adelroth E. How to measure airway inflammation: bronchoalveolar lavage and airway biopsies. *Can Respir J* 1998; 5:18A-21A.
35. Hargreave FE, Leigh R. Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:S53-7.
36. Seggev JS, Thornton Jr WH, Edes TE. Serum leukotriene B4 levels

in patients with obstructive pulmonary disease. *Chest* 1991;99:289-91.

37. Viglio S, Iadarola P, Lupi A, Trisolini R, Tinelli C, Balbi B, et al. MEKC of desmosine and isodesmosine in urine of chronic destructive lung disease patients. *Eur Respir J* 2000; 15:1039-45.
38. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:731-7.
39. Barnes P. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269-280.
40. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzo H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1666-72.
41. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:822-6.
42. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:852-7.

43. Pesci A, Balbi B, Majori M, et al. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1998;12:380-6.
44. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin- 8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:530-4.
45. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, et al. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1646-52.
46. Lapperre TS, Snoeck-Stroband JB, Gosman, Stolk J, Sont JK, Jansen DF, Kerstjens AM, Postma DS, Sterk PJ. Dissociation of Lung Function and Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004; 170(5): 499 - 504.
47. Hill AT, Bayley D, Stockley RA. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:893-8.
48. Liu AN, Mohammed AZ, Rice WR, et al. Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor- α : relative

- insensitivity to Fas ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:849-58.
49. Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *AmJ Respir Crit Care Med* 1999;160:S49-S52.
50. Corradi M, Pignatti P, Manini P, et al. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J* 2004; 24: 1011–1017.
51. Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases: matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1100-2.
52. Liu AN, Mohammed AZ, Rice WR, et al. Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor-alpha: relative insensitivity to Fas ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:849-58.
53. Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *AmJ Respir Crit Care Med* 1999;160:S49-S52.
54. Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, et al. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1290-5.

55. Yoshioka A, Betsuyaku T, Nishimura M, Miyamoto K, Kondo T, Kawakami Y. Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2127-32.
56. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 1990;85:682-9.
57. Witko-Sarsat V, Halbwachs-Mecarelli L, Schuster A, et al. Proteinase 3 a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:729-36.
58. Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:240-7.
59. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:341-57.
60. Dekhuijzen PNR, Aben KK, Dekker I, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*

1996;154:813-6.

61. Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2 α -III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1709-14.
62. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, et al. Breath condensate analysis of 8-isoprostane: a new approach for assessment of oxidative stress in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:Suppl:A798. abstract.
63. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B — a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-71.
64. Oudijk EJD, Lammers, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 2003; 22: 5S - 13s.
65. Wouters E. Local and Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc Vol 2*. pp 26–33, 2005 DOI: 10.1513/pats.200408-039MS.
66. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*

1999;340:115–26.

67. Kotler DP. Cachexia. *Ann Intern Med* 2000;133:622–34.
68. Johnson PM, Vogt SK, Burney MW, et al. COX-2 inhibition attenuates anorexia during systemic inflammation without impairing cytokine production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:650–6.
69. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999;45:1353–8.
70. Schunemann HJ, Dorn J, Grant BJ, et al. Pulmonary function is a long-term predictor of mortality in the general population: 29-year follow-up of the Buffalo Health Study. *Chest* 2000;118:656–64.
71. Hole DJ, Watt GC, Davey-Smith G, et al. Impaired lung function and mortality risk in men and women: findings from the Renfrew and Paisley prospective population study. *BMJ* 1996;313:711–5.
72. Friedman GD, Klatsky AL, Siegelau AB. Lung function and risk of myocardial infarction and sudden cardiac death. *N Engl J Med* 1976;294:1071–5.
73. Schols AM. Pulmonary cachexia. *Int J Cardiol* 2002;85:101–10.
74. Biskobing DM. COPD and osteoporosis. *Chest* 2002;121:609–20.

75. Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003;21:347–60
76. Donaldson, Seemungal T, Patel I, Tom A, Wilkinson M, Hurst J, MacCallum P, Wedzicha JA. Airway and Systemic Inflammation and Decline in Lung Function in Patients With COPD. *Chest*. 2005;128:1995-2004
77. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004; 59: 574 - 580.
78. Izquierdo JL, Sánchez I, Fernadez J, et al. Utility of transfer factor to detect different bronchodilator responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 1998; 65: 282-288.
79. Weir DC, Gove IR, Robertson AS, Sherwood PB. Response to corticosteroids in chronic airflow obstruction: Relationship to emphysema and airways collapse. *Eur respir J* 1991; 4: 1185-1190.

80. Eliasson O, Degraff AC. The use of criteria for reversibility and obstruction to define patient groups for bronchodilator trials. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 858-864.
81. Izquierdo JL, Juretschke MA, Ramos A, et al. Utility of complete dead space washout by real time gas analysis in the measurement of transfer factor in patients with chronic airflow limitation. *Respiration* 1996; 63: 339-345.
82. Suki B, Lutchen KR, Ingenito EP. On the progressive nature of emphysema: roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:516– 21.
83. Montuschi P. Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. *Clinica Chimica Acta* 356 (2005) 22–34
84. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled Markers of Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1693–1722.
85. Gaston B. Breath condensate analysis: Perhaps worth studying, after all. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:292-93
86. Baraldi E, et al. Safety and success of exhaled breath condensate collection in asthma. *Archives of Disease in Childhood* 2003; 88: 358-60.

87. Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:28-34.
88. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:S31-7.
89. Antczak A, Gorski P. Markers of pulmonary diseases in exhaled breath condensate. *Int J Occup Med Environ Health* 2002;15:317-23.
90. Montuschi P, Barnes PJ. Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:232– 7.
91. Dwyer TM. Expired breath condensate (EBC) and the ultimate disposition of airway surface liquid (ASL). *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A406.
92. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions *Eur Respir J* 2005; 26: 523–548.
93. Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, et al. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive

- pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1380–1386.
94. Marteus H, Törnberg DC, Weitzberg E, Schedin U, Alving K. Origin of nitrite and nitrate in nasal and exhaled breath condensate, and the relation to nitric oxide formation. *Thorax* 2005; 60: 219–225.
95. Reinhold P, Jaeger J, Schroeder C. The collection of exhaled breath condensate depends on various variables of ventilation. Discussion: Assessing respiratory function: Chemically sound. Selected Abstracts. Exhaled Breath Condensate. ERS – Copenhagen 2005, September 17th – 21th.
96. Schleiss MB, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnussen H, Jorres RA. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur Respir J* 2000; 16: 1115–1118.
97. Huszar E, Vass G, Vizi E, et al. Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J* 2002; 20: 1393–1398.
98. Effros R, et al. Dilution of Respiratory Solutes in Exhaled Condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:663–669.

99. Effros RM, Biller J, Foss B, et al. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1500–1505.
100. Vass G, et al. Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 850–55.
101. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski T, et al. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway chemistry. *Eur Respir J* 2003; 22: 889–894.
102. Sznajder JL, Fraiman A, Hall JB, et al. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1989; 96: 606–612.
103. Culpitt SV, Russell REK. The measurement of hydrogen peroxide in airway disease. *Eur Respir Rev* 1999; 68: 246–248.
104. Carpenter C, Price P, Christmas B. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury and ARDS. *Chest* 1998; 114: 1653–1659.
105. Latzin P, Griesse M. Exhaled hydrogen peroxide, nitrite and nitric oxide in healthy children: decrease of hydrogen peroxide by atmospheric nitric oxide. *Eur J Med Res* 2002; 7: 353–358.

106. Gessner C, Kuhn H, Seyfarth H-J, et al. Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* 2001; 55: 414–419.
107. Corradi M, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Bodini A, Piacentini G, Carraro S, Zanconato S, Baraldi E. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation.. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:292-3.
108. Griesse M, Noss J, von Bredow C. Protein pattern of exhaled breath condensate and saliva. *Proteomics* 2002; 2: 690–696.
109. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May 15;165(10):1364-70.
110. Ricciardolo FL, Rado V, Fabbri LM, Sterk PJ, Di Maria GU, Geppetti P. Bronchoconstriction induced by citric acid inhalation in guinea pigs: role of tachykinins, bradykinin, and nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Feb;159(2):557-62.
111. Luk CK, Dulfano MJ. Effect of pH, viscosity and ionic-strength changes on ciliary beating frequency of human bronchial explants. *Clin Sci (Lond)*. 1983 Apr;64(4):449-51.

112. Holma B, Hegg PO. pH- and protein-dependent buffer capacity and viscosity of respiratory mucus. Their interrelationships and influence on health. *Sci Total Environ*. 1989 Aug;84:71-82.
113. Holma B, Lindegren M, Andersen JM. pH effects on ciliomotility and morphology of respiratory mucosa. *Arch Environ Health*. 1977 Sep-Oct;32(5):216-26.
114. Van Beurden WJ, Harff GA, Dekhuijzen PN, van der Poel-Smet SM, Smeenk FW. Effects of inhaled corticosteroids with different lung deposition on exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients. *Respiration* 2003;70:242-8.
115. Van Beurden WJ, Harff GA, Dekhuijzen PN, van den Bosch MJ, Creemers JP, Smeenk FW. An efficient and reproducible method for measuring hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Respir Med* 2002;96:197-203.
116. Hill AT, Bayley D, Stockley RA. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Sep;160(3):893-8.
117. Zakrzewski JT, Barnes NC, Costello JF, Piper PJ. Lipid mediators in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1987 Sep;136(3):779-82.

118. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax*. 2003 Jul;58(7):585-8.
119. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 2003;58:294-8.
120. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 2003;58:294-8.
121. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur Respir J* 2003;21:589-93.
122. Antczak A, Montuschi P, Kharitonov S, Gorski P, Barnes PJ. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:301-6.
123. Nakamura H, Yoshimura K, Jaffe HA, Crystal RG. Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem*. 1991 Oct 15;266:19611-7.

124. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 1989 Oct;84(4):1045-9
125. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990 Oct 11;323(15):1033-9.
126. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, Vic P, Enander I, Godard P, Michel FB. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1993 Oct;92(4):537-48.
127. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, Narita N. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest.* 1997 Aug;112(2):505-10.
128. Cotes JE, Dabbs JM, Elwood PC, may AM, McDonald A, Saunders MJ. Iron-deficiency anaemia: its effect on transfer factor for the lung (diffusing capacity) and ventilation and cardiac frequency during submaximal exercise. *Clin Sci* 1972; 42: 325-335.
129. Miniati M, Filippi E, Falaschi F, Carrozzi L, Milne E, Sostman H,

- Pistolesi M. Radiologic evaluation of emphysema in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151:1359-1367.
130. Reid L, Millard FJ. Correlation Between Radiological Diagnosis And Structural Lung Changes In Emphysema. *Clin Radiol*. 1964 Oct;15:307-11.
131. Sutinen S, Christoforidis Aj, Klugh Ga, Pratt Pc. Roentgenologic Criteria For The Recognition Of Nonsymptomatic Pulmonary Emphysema. Correlation Between Roentgenologic Findings And Pulmonary Pathology. *Am Rev Respir Dis*. 1965 Jan;91:69-76.
132. Nicklaus TM, Stowell DW, Christiansen WR, Renzetti AD Jr. The accuracy of the roentgenologic diagnosis of chronic pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1966 Jun;93(6):889-99.
133. Katsura S, Martin CJ. The roentgenologic diagnosis of anatomic emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1967 Oct;96(4):700-6.
134. Thurlbeck WM, Simon G. Radiographic appearance of the chest in emphysema. *Am J Roentgenol*. 1978 Mar;130(3):429-40.
135. Foster WL Jr, Pratt PC, Roggli VL, Godwin JD, Halvorsen RA Jr, Putman CE. Centrilobular emphysema: CT-pathologic correlation. *Radiology*. 1986 Apr;159(1):27-32.

136. Bergin C, Muller N, Nichols DM, Lillington G, Hogg JC, Mullen B, Grymaloski MR, Osborne S, Pare PD. The diagnosis of emphysema. A computed tomographic-pathologic correlation. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Apr;133(4):541-6.
137. Morrison NJ, Abboud RT, Muller NL, Miller RR, Gibson NN, Nelems B, Evans KG. Pulmonary capillary blood volume in emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Jan;141(1):53-61.
138. Kuwano K, Matsuba K, Ikeda T, Murakami J, Araki A, Nishitani H, Ishida T, Yasumoto K, Shigematsu N. The diagnosis of mild emphysema. Correlation of computed tomography and pathology scores. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Jan;141(1):169-78.
139. Engelen MP, Schols AM, Lamers RJ, Wouters EF. Different patterns of chronic tissue wasting among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Nutr* 1999;18:275–80.
140. Engelen MP, Deutz NE, Mostert R, Wouters EF, Schols AM. Response of whole-body protein and urea turnover to exercise differs between patients with chronic obstructive pulmonary disease with and without emphysema. *Am J Clin Nutr*. 2003 Apr;77(4):868-74.
141. Gan WQ, Man SF, Sin DD. The interactions between cigarette smoking and reduced lung function on systemic inflammation.

Chest. 2005 Feb;127(2):558-64.

142. Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NH, et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Thorax* 2000; 55: 12–18.
143. Suki B, Lutchen KR, Ingenito EP. On the progressive nature of emphysema: roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Sep 1;168(5):516-21.
144. Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1635-9.
145. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:542-8.
146. Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol* 1996;156:4422-8.
147. Nightingale JA, Rogers DF, Fan Chung K, Barnes PJ. No effect of inhaled budesonide on the response to inhaled ozone in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:479-86.

148. Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K. Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999;353:1819-23.
149. Burge PS, Calverley PMA, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Maslen TK. Randomised, double-blind, placebo-controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial. *BMJ* 2000;320:1297-303.
150. Paggiaro PL, Dahle R, Bakran I, Frith L, Hollingworth K, Efthimou J. Multicentre randomised placebo-controlled trial of inhaled fluticasone propionate in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 1998;351:773-80.
151. Niewoehner DE, Erbland ML, Deupree RH, et al. Effect of systemic glucocorticoids on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1999;340:1941-7.
152. Nishimura K, Koyama H, Ikeda A, Tsukino M, Hajiyo T, Mishima M, Izumi T. The effect of high-dose inhaled beclomethasone dipropionate in patients with stable COPD. *Chest*. 1999 Jan;115(1):31-7.
153. Weiner P, Weiner M, Azgad Y, Zamir D. Inhaled budesonide

therapy for patients with stable COPD. *Chest*. 1995 Dec;108(6):1568-71.

154. Weiner P, Weiner M, Rabner M, Waizman J, Magadle R, Zamir D. The response to inhaled and oral steroids in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Intern Med*. 1999 Jan;245(1):83-9.
155. Kerstjens HA, Brand PL, Quanjer PH, van der Bruggen-Bogaarts BA, Koeter GH, Postma DS. Variability of bronchodilator response and effects of inhaled corticosteroid treatment in obstructive airways disease. Dutch CNSLD Study Group. *Thorax*. 1993 Jul;48(7):722-9.
156. Kerstjens HA, Overbeek SE, Schouten JP, Brand PL, Postma DS. Airways hyperresponsiveness, bronchodilator response, allergy and smoking predict improvement in FEV1 during long-term inhaled corticosteroid treatment. Dutch CNSLD Study Group. *Eur Respir J*. 1993 Jun;6(6):868-76.
157. Dompeling E, van Schayck CP, Molema J, Folgering H, van Grunsven PM, van Weel C. Inhaled beclomethasone improves the course of asthma and COPD. *Eur Respir J*. 1992 Sep;5(8):945-52.
158. Burge PS. EUROSCOP, ISOLDE and the Copenhagen city lung

study. *Thorax*. 1999 Apr;54(4):287-8.

159. Sin DD, Tu JV. Inhaled corticosteroids and the risk of mortality and readmission in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Aug 15;164(4):580-4.
160. Vestbo J; TORCH Study Group. The TORCH (towards a revolution in COPD health) survival study protocol. *Eur Respir J*. 2004 Aug;24(2):206-10.
161. J C Bestall, E A Paul, R Garrod, R Garnham, P W Jones, J A Wedzicha. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;581-586.

